

Aus Dem Lehrstuhl Für Innere Medizin I
Direktor: Professor Dr. med. J. Schölmerich

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität Regensburg

**Effekte von Testosteron und 17 β -Östradiol auf die
Zytokinsekretion peripherer humaner Leukozyten im
Zusammenspiel mit Kortisol**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

David Janele

2009

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 18.8.2009

Inhalt

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

1.1.1. Das Immunsystem

1.1.2. Kortisol und seine Wirkung

1.1.3. Der humane Glukokortikoidrezeptor

1.1.4. Testosteron und 17 β -Östradiol

1.2. Die Bedeutung von Testosteron und 17 β -Östradiol auf das Immunsystem

1.2.1. Die Wirkung von Androgenen

1.2.2. Die Wirkung von Östrogenen

1.3. Mögliche Hypothesen zur Interaktion Testosteron/17 β -Östradiol und Kortisol

1.4. Zielsetzung der Dissertation

2. Material und Methoden

2.1. Die Vollblutkultur

2.1.1. Verwendete Materialien

2.1.2. Mengenverhältnisse und Stimulation

2.1.3. Hormonkonzentrationen

2.1.4. Zeitliche Verläufe

2.2. ELISA

2.3. Westernblot und Densitometrie

2.4. Statistik und verwendete Software

3. Ergebnisse

3.1. Zytokinsekretion

3.1.1. Interleukin 6

3.1.2. Interferon gamma

3.1.3. Interleukin 4

3.1.4. Interleukin 10

3.1.5. Tumor-Nekrose-Faktor

3.1.6. Interleukin 2

3.2. Kortisolwirkung auf die Zytokinsekretion

3.2.1. Interleukin 6

3.2.2. Interferon gamma

3.2.3. Interleukin 4

3.2.4. Interleukin 10

3.2.5. Tumor-Nekrose-Faktor

3.2.6. Interleukin 2

3.3. Quotient aus Interferon gamma und Interleukin 4

3.3.1. Unter Kortisolzugabe

3.3.2. Ohne Kortisolzugabe

3.3.3. Direkter Vergleich Kortisol - kein Kortisol

3.4. Expression des humanen Glukokortikoidrezeptors

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Danksagung

8. Lebenslauf

9. Publikation

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

1.1.1. Das Immunsystem

Ein wichtiges Fachgebiet der humanmedizinischen Wissenschaft ist die Immunologie, die Lehre des menschlichen Abwehrsystems. Eine wichtige Rolle dabei spielen chemische Botenstoffe, so genannte Zytokine, die von verschiedenen Zellen gebildet werden, und eine wichtige Schlüsselrolle bei der Vermittlung, Steuerung und Unterdrückung von Entzündungsmechanismen haben.

Bei den Reaktionen des Immunsystems unterscheidet man zwischen spezifischen, gegen bestimmte Antigene gerichteten (*adaptive immunity*), und unspezifischen Aktionen, die dem allgemeinen Schutz und der Vorbeugung von Infektionen dienen (*innate immunity*). Des Weiteren unterscheidet man zwischen zellvermittelter und humoraler Abwehr. Eine zentrale Stellung bei der Initiierung und Steuerung nimmt die T-Helfer-Zelle ein. Je nach Art der Antwort unterscheidet man zwischen einer T-Helfer-1 (Th1)- und einer T-Helfer-2 (Th2)-Reaktion (1,2). Die Th1-Antwort dient der Aktivierung zellvermittelter Immunabwehr. Als wichtigste Zytokine sind hier Interleukin (IL)-12 und Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) zu nennen (3,4). Bei der Th2-Antwort steht die Aktivierung von B-Zellen mit der Bildung von Antikörpern und somit des Aufbaus einer humoralen Immunantwort im Vordergrund. Wichtigstes Zytokin im Rahmen der Th2-Differenzierung der T-Helfer-Zelle ist das IL-4 (4,5). Als Hinweis, ob eine Änderung der T-Zell-Differenzierung vorliegt, kann das Verhältnis von $\text{IFN}\gamma$ zu IL-4 bestimmt werden, da diese beiden Zytokine eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der T-Zell-Subpopulationen zu haben scheinen (2,3,5). Als weitere wichtige Zytokine sind $\text{TNF}\alpha$ als wichtiger Marker für die Makrophagenaktivität und als Zeichen einer lokalen Entzündungsre-

aktion (6,7), IL-2 als von T-Zellen autokrin sezernierter Wachstumsfaktor (8), IL-6 als T-Zell- und Makrophagen-sezerniertes Akute-Phase-Interleukin und IL-10 als Makrophageninhibitor und entzündungshemmendes Zytokin (9) zu nennen(10).

Die Quantifizierung der verschiedenen Zytokine gelingt *in vitro* mit Hilfe der ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*)-Technik.

1.1.2. Kortisol und seine Wirkung

Kortisol ist ein körpereigenes Hormon, sein Produktionsort ist die Nebennierenrinde. Die Ausschüttung dieses Hormons unterliegt dabei einem strengen Regelkreis. Mittels Hypothalamus und Hypophyse wird adrenokortikotropes Hormon (ACTH) freigesetzt, welches als Stimulus für die Kortisolsekretion dient. Kortisol wirkt im Sinne eines negativen Regelkreises hemmend auf Hypothalamus und Hypophyse. Die normale Serumkonzentration für Kortisol liegt tageszeitabhängig zwischen 0.14 und 0.69 $\mu\text{mol/l}$ (11).

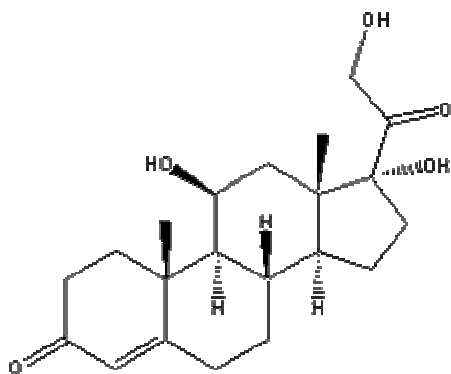


Abbildung 1: Strukturformel des Kortisol.

H Wasserstoff, O Sauerstoff.

Der Wirkmechanismus des Kortisol ist seit mehreren Jahrzehnten im Mittelpunkt intensiver Forschungsarbeit. Der „klassische“ Wirkmechanismus umfasst dabei einen Transkriptions-

vorgang auf DNA-Ebene (12,13). Hierbei passiert das lipophile Molekül die Zellmembran und bindet an den ubiquitär exprimierten zytosolischen humanen Glukokortikoidrezeptor (hGR). Nach Dissoziation diverser *heat shock*-Proteine (HSP) interagiert der hGR als Dimer direkt mit bestimmten DNA-Regionen und beeinflusst die Transkription (14-17). Nach entsprechender Translation liegen bestimmte Proteine vor, die ihre jeweiligen Wirkungen entfalten können. Als Beispiele sind Proteine der Annexin-Familie (z.B. Lipokortin-1 mit besonderer Bedeutung für die Entzündungshemmung) (18), Endonukleasen, neutrale Endopeptidasen und Angiotensin-konvertierendes-Enzym zu nennen. Auf demselben Wege der DNA-Bindung kommt es auch zur Inhibition der Transkription bestimmter Genabschnitte. Dadurch kommt es zur verminderten Synthese diverser Zytokine wie dem $\text{TNF}\alpha$, dem IL-2, IL-6 (19), sowie der Stickstoffmonoxyd (NO)-Synthetase und der Cyclooxygenase 2 (COX2) über eine Hemmung des nukleären Faktors κB (NF- κB) (20,21). Glukokortikoide scheinen auch eine Verschiebung des Th1/Th2-Verhältnisses zugunsten einer Th2-Immunantwort zu bewirken (22). Darüber hinaus werden Effekte auf mRNA-Stabilität und –Translation diskutiert (23,24). Es gibt zudem Hinweise, dass direkte Membraninteraktionen des Kortisol zur Wirkung beitragen und insbesondere den schnellen Wirkungseintritt erklären können (25,26). Es wurden darüber hinaus membrangebundene Glukokortikoidrezeptoren (mGCR) nachgewiesen (27), die ebenfalls für schnelle Glukokortikoideffekte in Frage kommen.

1.1.3. Der humane Glukokortikoidrezeptor

Der hGR ist ein Polypeptid und kommt hauptsächlich in 2 Isoformen vor. Der hGR α besteht aus 777 Aminosäuren (98kD) und ist maßgeblich für die Wirkung verantwortlich (17,28). Der hGR β besteht aus 742 Aminosäuren (94kD), von denen die ersten 727 identisch mit dem hGR α sind. Er ist nicht in der Lage Kortisol zu binden, und somit eine Wirkung zu entfalten (28-30). Der hGR β kann als Gegenspieler zum aktiven hGR α betrachtet werden, da er die

Aktivität dessen kompetitiv zu hemmen scheint (28-31). Andererseits gibt es aber auch widersprüchliche Ergebnisse (32), so dass die genaue Bedeutung des hGR β noch unklar ist. Des Weiteren konnte bis jetzt auch ein hGR γ identifiziert werden, der ebenfalls die hGR α -Aktivität zu hemmen scheint und im Gewebe zu einem relativ hohen Prozentsatz exprimiert wird (33).

Der Nachweis der unterschiedlichen Subtypen ist mit einem hohen methodischen Aufwand verbunden. Zum Nachweis des Gesamt-hGR dagegen gibt es bewährte Protokolle (34).

Der zytosolische hGR α interagiert nach Kortisolbindung, HSP-Dissoziation und Dimerisierung an bestimmte DNA-Domänen, sogenannte *glucocorticoid responsive elements* (GRE), und führt zur Transkription bestimmter Genabschnitte (14,17,28). Daneben kommt es zu Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie dem AP-1 oder dem NF- κ B, was in diesem Fall zu einer Verminderung der Transkription (z.B. proinflammatorischer Komponenten) führt (20,21,35).

Es konnte nachgewiesen werden, dass der hGR β in entzündlichem Milieu im Vergleich zum hGR α stärker exprimiert wird (36,37), und offensichtlich in entzündlichem Kontext zu einer geringeren Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten unter Glukokortikoidtherapie führt (36).

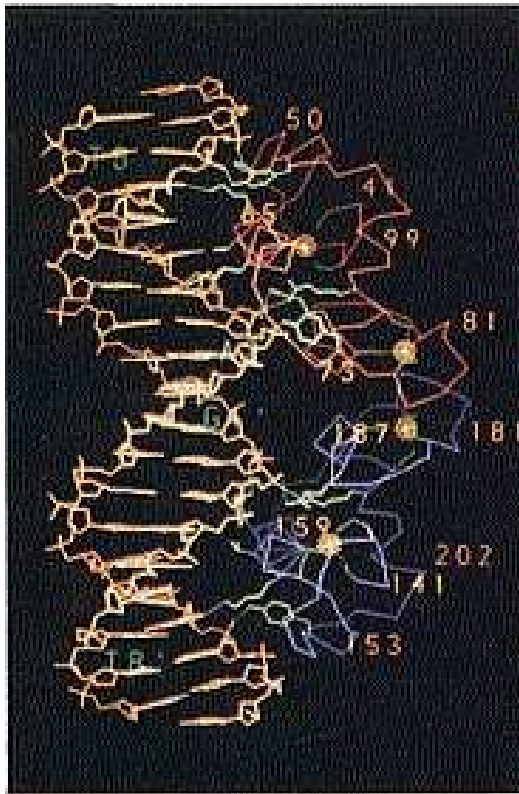


Abbildung 2: Darstellung der Interaktion des dimerisierten hGR mit der DNA.

Die rote und blaue Polypeptidstruktur (rechts im Bild) entsprechen jeweils einem Steroidrezeptor, die gelben Punkte entsprechen zentralen Zinkatomen, die gelbe Doppelhelix auf der linken Bildseite stellt die menschliche DNA dar.

1.1.4. Testosteron und 17 β -Östradiol

Das männliche Geschlechtshormon Testosteron ist ein Steroid mit einem Molekulargewicht von 288D und wird körpereigen sowohl in der Nebennierenrinde (hier nur zu etwa 3% der Gesamtmenge bei Männern) als auch von den Leydig-Zellen des männlichen Hodens produziert. Die Regulation erfolgt auch hier über einen komplexen Regelkreis, in welchen Hypothalamus und Hypophyse integriert sind. Die normalen Plasmaspiegel liegen beim Mann bei 10 bis 35 nmol/l, bei der Frau bei etwa 0,7 bis 3,5 nmol/l (11). Im peripheren Gewebe erfolgt eine Umwandlung in die wirkungsstärkere Form 5 α -Dihydrotestosteron. Die Wirkung auf

zellulärer Ebene ist ebenfalls komplex und erfolgt über einen weiteren Rezeptor der Steroidfamilie, den Androgenrezeptor. Dieser Rezeptor weist Strukturähnlichkeiten zum hGR auf, er liegt ebenfalls im Zytoplasma vor, und bindet nach Hormonbindung und Translokation in den Zellkern an bestimmte Genabschnitte (16,38,39). Neben geschlechtsspezifischen Wirkungen kommt es zu allgemein anabolen Effekten (11).

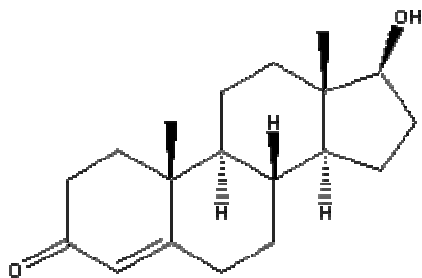


Abbildung 3: Strukturformel des Testosterons.

H Wasserstoff, O Sauerstoff.

Das weibliche Geschlechtshormon 17 β -Östradiol (E2) ist ebenfalls ein Steroidhormon (272D Molekulargewicht) und wird über einen hypothalamisch-hypophysären Regelkreis gesteuert. Die Bildung erfolgt in den Ovarien und der Nebennierenrinde. Die physiologischen Plasmaspiegel liegen bei der Frau zyklusabhängig zwischen 0.1 (Follikelphase) und 1 nmol/l (Lutealphase und Ovulation), bei Schwangerschaft bis zu etwa 10 nmol/l. Beim Mann finden sich Werte um 0.04 bis 0.1 nmol/l (11). E2 bindet an einen weiteren zytosolischen Rezeptor aus der Steroidrezeptor-Superfamilie, dem Östrogenrezeptor (ER), der aus 595 Aminosäuren besteht und ebenfalls eine ausgeprägte Homologie zum hGR aufweist. Beim Östrogenrezeptor gibt es 2 Subtypen, den ER α und den ER β . Der Wirkmechanismus ist dem des Androgenrezeptors und des hGR eng verwandt (16,38). Neben zyklusabhängigen Effekten auf die weiblichen Fortpflanzungsorgane besitzt es leichte proteinanabole Wirkungen auf die übrigen Körpergewebe (11).

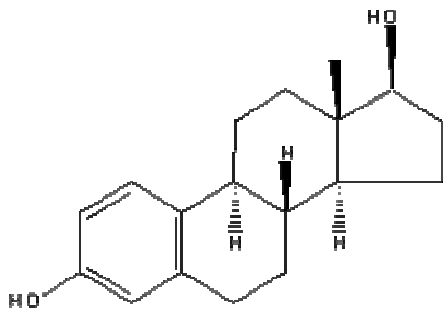


Abbildung 4: Strukturformel des 17 β -Östradiol

H Wasserstoff, O Sauerstoff.

1.2. Die Bedeutung von Testosteron und 17 β -Östradiol auf das Immunsystem

Der Bedeutung der geschlechtsspezifischen Hormone auf die Funktionen des Immunsystems ist besonderes Interesse zu widmen. Die Tatsache, dass die meisten Autoimmunkrankheiten ein Geschlechtsverhältnis von deutlich mehr Frauen zu Männern aufweisen, spricht für eine mögliche Rolle der hormonellen Einflüsse auf die Pathogenese und wird seit Jahren in zahlreichen Übersichtsarbeiten diskutiert (40-48).

Tabelle 1: Zahlenverhältnis erkrankter Frauen zu Männern bei Autoimmunkrankheiten (45).

Krankheit	Verhältnis Frau:Mann
Multiple Sklerose	2,5:1
Rheumatoide Arthritis	3:1
Morbus Addison	4:1
Thrombozytopenische Purpura	4:1
Takayasu Arteriitis	6-7:1
Hashimoto Thyreoiditis	10:1
Systemischer Lupus erythematoses	10:1
Sjögren Syndrom	12:1

Darüber hinaus gibt es zahlreiche Therapieansätze bei Autoimmunerkrankungen, beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis, die auf einer Hormonsubstitution beruhen (47,49,50). Hierbei wird die Erkenntnis genutzt, dass ältere Menschen nicht mehr ausreichend hohe Plasmahormonspiegel haben (51), beziehungsweise, dass diese unter dem negativen Einfluss chronischer Entzündungen inadäquat niedrig sind (52-54). Ebenso konnte der Nutzen einer Substitution mit einer Hormonvorläufersubstanz, dem Dehydroepiandrosteron (DHEA) gezeigt werden (55,56).

1.2.1. Die Wirkung der Androgene

Unter experimentellen Bedingungen konnte nachgewiesen werden, dass Androgene sowohl auf die unterschiedlichen Immunzellpopulationen als auch auf die Zytokinsekretion einen Einfluss haben. Man beobachtete eine Zunahme der Aktivität der CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen und Suppressor-T-Zellen, sowie eine Abnahme der peripheren B-Zellen und deren Antikörperproduktion (57,58). Des Weiteren konnte eine Abnahme vieler Zytokine beobachtet werden, des IL-1, IL-2, IL-4 und des IFN γ (59-63). Darüber hinaus scheinen Androgene T- und B-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheiten günstig zu beeinflussen (46,47,63). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass bis dato keine Androgenrezeptoren auf peripheren Lymphozyten gefunden werden konnten, jedoch auf humanen Thymozyten (64,65).

1.2.2. Die Wirkung der Östrogene

Östrogene scheinen unter experimentellen Bedingungen mitogeninduzierte T-Zell-Antworten, sowie die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und Suppressor-T-Zellen zu hemmen, dagegen die B-Zell-Aktivität zu steigern (66,67). Die Antikörperproduktion der B-Zellen konnte

ebenfalls gesteigert werden (63). Bezüglich der Zytokinsekretion fand sich ein Ansteigen der IL-1-, IL-2-, IL-4- und der IFN γ -Spiegel, dagegen ein Absinken des IL-6 (63,65,68-70). Es konnten Östrogenrezeptoren in humanen Synovialmakrophagen, peripheren CD8-positiven Lymphozyten, jedoch nicht in T-Helfer-Zellen nachgewiesen werden (64,71,72). Die Wirkung der Östrogene ist von vielerlei Faktoren abhängig (48). Erwähnt werden hierzu die Art der Immunstimulierung, die beteiligten Zelltypen (beispielsweise B- versus T-Zelle), das Zielgewebe mit seinem lokalen Milieu, der Zeitpunkt der Entzündungsreaktion (Frühphase versus Spätphase), die lokalen Östrogenkonzentrationen, die Unterschiede bei der Expression der Rezeptorsubtypen (ER α und ER β), und die intrazelluläre Östrogenmetabolisierung (48).

1.3. Mögliche Hypothesen zur Interaktion Testosteron/17 β -Östradiol und Kortisol

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Androgene einen hemmenden Effekt auf die T- und B-Zell-Funktion, sowie auf Th1- und Th2-Zytokine, Östrogene dagegen nur eine Hemmung der T-Zell-Funktion, im Gegensatz dazu jedoch eine Steigerung der B-Zell-Aktivität und der Th1- und Th2-spezifischen Zytokine zu bewirken scheinen.

Des Weiteren fanden sich unterschiedliche Ansprechverhalten der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) in Hinsicht auf die Kortisolsekretion. Androgene scheinen das Ansprechverhalten der HPA-Achse im Tierexperiment zu hemmen und zu einer Verminderung der Plasmakortisolsekretion zu führen (73-77), Östrogene steigerten dagegen tierexperimentell die HPA-Achsen-Sensitivität bei chronischen Entzündungen (73,78-80), beziehungsweise senkten sie bei proentzündlichen Stimuli (81,82). Entsprechende Ergebnisse fanden sich auch beim Menschen: Östrogene scheinen die Kortisolausschüttung zu steigern (83-87), beziehungsweise unter proentzündlichem Stimulus zu senken, ebenso wie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach Endotoxingabe (88). Androgene im Ge-

gensatz hierzu senkten die Plasmakortisolspiegel beim Menschen (89) und verbessern offensichtlich das Ansprechverhalten proinflammatorischer Zytokine auf Kortisol (90,91).

Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch weitgehend ungeklärt. Man fand im Hypothalamus eine Steigerung der CRH-mRNA unter Östrogeneinfluss (92), was einer Steigerung der Achsenfunktion entsprechen würde. Die Androgenwirkung scheint sich zum Teil durch eine Steigerung des Kortisoleffekts im Rahmen des Rückkoppelungsmechanismus auf Hypothalamus und Hypophyse zu erklären (76).

Grundsätzlich sind mehrere Mechanismen denkbar, um eine Interaktion zwischen Geschlechtshormonen und Kortisol zu erklären. Zunächst ist zu erwähnen, dass in den meisten Immunzellen Rezeptoren für alle 3 Hormone vorhanden sind, außer dem Androgenrezeptor in peripheren Lymphozyten (64,65,72), so dass auf jeden Fall direkte Effekte dieser Hormone erwarten werden könnten. Des Weiteren gibt es deutliche Rezeptorhomologien für den hGR, Östrogen- und Androgenrezeptor (16), so dass auch hier eine mögliche Interaktion bei der weiteren Signalverarbeitung denkbar wäre. Mögliche synergistische Effekte ließen sich auch durch ähnliche intrazelluläre Koaktivierungen oder Hemmungen von NF- κ B, AP-1 oder anderen Transkriptionsfaktoren durch die entsprechenden Hormonrezeptoren erklären (20,21,93,94). Darüber hinaus wären mögliche Veränderungen der Rezeptorenzahl, des Rezeptortyps und damit des Ansprechverhaltens ein möglicher Erklärungsansatz.

1.4. Zielsetzung der Dissertation

1. Die Charakterisierung der Interaktionen zwischen jeweils Testosteron als wichtigstem Androgen oder E2 als wichtigstem Vertreter der Östrogene beim Menschen auf der einen Seite und Kortisol auf der anderen Seite in vitro anhand der Quantifizierung von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ und TNF α .
2. Verifizierung einer der möglichen Hypothesen der Interaktion, die Testosteron- beziehungsweise E2-abhängige Regulation des hGR, mittels direkten Nachweises des hGR.

2. Material und Methoden

2.1. Die Vollblutkultur

Die erste Überlegung war, die Experimente mit Vollblutkulturen durchzuführen. Grundsätzlich sollte vermieden werden, durch den Vorgang der Trennung der Leukozyten von den anderen Blutbestandteilen Subpopulationen von Leukozyten zu erhalten. Eine Selektion könnte sich auf das Ergebnis der Messungen auswirken. Des Weiteren mag ein solcher Vorgang bereits Einflüsse auf Leukozyten haben, denkbar wären mechanische sowie chemische Reize durch wiederholte Zentrifugation und Ersatz des „gewohnten“ Mediums, beziehungsweise eventuelle Lyseverfahren. Darüber hinaus sollten die Experimente in einem möglichst physiologischen Umfeld erfolgen, also bei Vorhandensein der anderen korpuskulären Blutbestandteile sowie des Blutplasmas.

Als Probanden wurden ausschließlich männliche Versuchspersonen verwendet, um einerseits hormonelle Schwankungen zu vermeiden und um andererseits keine zyklusabhängigen Unregelmäßigkeiten bei der Zytokinproduktion zu riskieren (95). Es wurden für die Zytokinmessungen insgesamt 5 (Alter von 24 bis 40 Jahren), für die Messung des hGR insgesamt 15 (Alter ebenfalls von 24 bis 40 Jahren) gesunde männliche Probanden herangezogen. Nach Erklärung des Vorhabens und einer kurzen Befragung nach Gesundheitszustand und eventueller Hormon- oder Medikamenteneinnahme (Ausschlusskriterium) willigten alle Probanden zur Blutentnahme ein.

Der Entnahmezeitpunkt des Bluts war zwischen 9 und 10 Uhr morgens (MESZ), um mögliche zirkadiane Effekte, vor allem des körpereigenen Kortisol zu unterbinden, was sowohl einen Einfluss auf die Zytokinsekretion, als auch auf die Zahl der peripheren Leukozyten hätte haben können (96,97). Die Blutentnahme erfolgte mittels vorheparinisierter Röhrchen. Das entnommene Material wurde sofort weiterverarbeitet.

2.1.1. Verwendete Materialien

Als Medium wurde serumfreies RPMI 1640 ohne Phenolrot (Sigma Aldrich, Taufkirchen) verwendet, da bereits frühere Untersuchungen zu dem Ergebnis geführt hatten, dass Phenolrot wie auch andere Phenole einen östrogenähnlichen Effekt haben können (98-100), wobei es zu diesem Thema auch widerlegende Untersuchungen gibt (101). Ebenso wären unerwünschte Effekte durch im Serum oder FCS enthaltene Hormone denkbar. Aus ähnlicher Überlegung und aus der Tatsache heraus, dass die Kulturzeiten relativ kurz waren (maximal 48 Stunden), wurde auf die Zugabe von Antibiotika und fungiziden Mitteln verzichtet. Die Kultur für die Zytokinmessung erfolgte in 48-Well-Platten (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

2.1.2. Mengenverhältnisse und Stimulation

Anhand multipler Vorversuche konnten bestimmte „optimale“ Vollblutvolumina in Hinsicht auf die Zytokinsekretion ermittelt werden. Ebenso wurde die Art der Stimulation (Concanavalin A (ConA) für IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ und TNF α ; LPS für IL-6) und die Konzentration der stimulierenden Substanzen (100 μ g/ml für ConA und 0,5ng/ml für LPS) ermittelt. Darüber hinaus ergaben sich unterschiedliche Stimulationszeiträume für die unterschiedlichen Zytokine (12h für IL-6, IL-10 und TNF α ; 24h für IL-2, IL-4 und IFN γ). Die folgende Tabelle gibt den Überblick:

Tabelle 2: Vollblutvolumina, Stimulation und Stimulationszeit für die gemessenen Zytokine. IL Interleukin, IFN Interferon, TNF Tumor-Nekrose-Faktor, ConA Concanavalin A, LPS Lipopolysaccharid

Zytokin	Vollblutvolumen [μ l]	Stimulation	Stimulationszeit [h]
IL-2	100	ConA 100 μ g/ml	24
IL-4	100	ConA 100 μ g/ml	24
IL-6	25	LPS 0,5 ng/ml	12
IL-10	100	ConA 100 μ g/ml	12
IFN γ	100	ConA 100 μ g/ml	24
TNF α	100	ConA 100 μ g/ml	12

2.1.3. Hormonkonzentrationen

Eine 24-stündige Vorinkubation der Kulturen erfolgte vor der Stimulation mit LPS/ConA und der Zugabe von Kortisol beziehungsweise Trägersubstanz (als Lösungsmittel für Kortisol, hier Benzylalkohol (BA)) mit Testosteron, 17 β -Östradiol beziehungsweise ausschließlich BA als Trägersubstanz für diese beiden Hormone, in jeweils dreifachem Ansatz. Die verwendeten Konzentrationen sollten dabei das physiologische Spektrum widerspiegeln (11): Testosteron wurde in den Konzentrationen 10^{-7} und 10^{-8} mol/l, E2 in den Konzentrationen 10^{-8} , 10^{-9} und 10^{-10} mol/l verwendet.

2.1.4. Zeitliche Verläufe

Nach der 24-stündigen Vorinkubation mit Hormon beziehungsweise BA erfolgte die Zugabe von Kortisol in der Konzentration 10^{-6} mol/l, beziehungsweise BA als Kontrolle. Diese Kortisolkonzentration ergab sich aus Vorversuchen und stellte die Konzentration mit der halbmaximalen Wirkung dar, ebenso entspricht dies einer hohen physiologischen Konzentration (11).

Des Weiteren erfolgte obig genannte Stimulation mit 0,5ng/ml LPS, beziehungsweise 100µg/ml ConA. Nach der genannten Zeitdauer von 12 beziehungsweise 24 Stunden erfolgte eine Abnahme des Überstandes, welcher sofort bei –30°C in 96-Well-Platten (Becton Dickinson, New Jersey, USA) konserviert wurde.

2.2. ELISA

Sämtliche Zytokine wurden mit ELISA-Technik gemessen. Dabei wurden die Antikörperpärchen-Kits der Firma BD Pharmingen (OptEIA, BD Pharmingen, San Diego, California, USA) verwendet. Nach eigener Optimierung der Antikörperkonzentrationen lagen die Intra-Assay-Variationskoeffizienten unter 10 %. Die Detektionsgrenze lag für die Zytokine unter 10 pg/ml.

2.3. Westernblot und Densitometrie

Der Ansatz für den Nachweis des hGR unterschied sich im Wesentlichen in der Menge des eingesetzten Vollbluts. Die 24-stündige Vorinkubation mit Testosteron 10^{-7} , E2 10^{-8} und 10^{-10} mol/l, beziehungsweise BA (Kontrolle) erfolgte in 25cm²-Kulturflaschen (Becton Dickinson) mit je 3ml Vollblut zuzüglich des jeweiligen Mediums (30ml) in jeweils dreifachem Ansatz. Nach der Inkubation erfolgte eine zweimalige Erythrozytenlyse mit destilliertem Wasser jeweils nach Zentrifugation, das Abstoppen der Reaktion nach 30 Sekunden mit 10x-PBS-Lösung (*phosphate buffered saline*) und ein Waschgang in PBS-Lösung (Sigma Aldrich). Die gewonnenen Leukozyten wurden nach erneuter Zentrifugation 30 Minuten mit einem Lysispuffer versetzt, der PMSF, SDS, NP-40, Natriumdesoxycholat und diverse Proteaseinhibitoren (*complete*, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim; die übrigen Reagenzien Sigma Aldrich) enthielt. Nach erneuter Zentrifugation konnte das Zelllysats im Überstand abpipettiert wer-

den. Die Proteinkonzentrationen wurden mit einem BCA-Reagenz-Kit der Firma Sigma Aldrich gemessen.

Die Gele (Novex, 8% *tris-glycine*, Invitrogen, Karlsruhe) wurden pro Bahn mit jeweils 25µg Protein beladen, nach Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran (Novex, Invitrogen) transferiert und eine Stunde in TBS-Lösung (*Tris-buffered saline*, Sigma Aldrich) mit 2,5% humanem Serumprotein (durch Zugabe von Humanserum, selbst hergestellt und gepoolt) und 2,5% Rinderserumalbumin (Biomol, Hamburg) geblockt. Die Membranen wurden anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung von 1:500 des Primärantikörpers gegen den hGR (Affinity Bioreagents, Golden, Colorado, USA) in TBS-Lösung mit 5% Magermilchpulver inkubiert und anschließend 30 Minuten viermal mit TBS gewaschen. Nach einer weiteren Inkubation bei Raumtemperatur mit einer 1:1000 Verdünnung des Sekundärantikörpers (Affinity Bioreagents) in TBS-Lösung mit 2,5% humanem Serumprotein und 2,5% Rinderserumalbumin und einem weiteren 30-minütigen viermaligen Waschgang in TBS wurden die Membranen mit Hilfe chemolumineszenter Agentien (ECL+, Amersham Biosciences, Amersham, UK) versetzt und die Ergebnisse auf Film (Hyperfilm, Amersham) gebracht. Die verschiedenen Antikörperkonzentrationen und verwendeten TBS-Zusätze ergaben sich aus mehreren Vorversuchen.

Die entwickelten Filme wurden eingelese und densitometrisch ausgewertet (Gerät von Molecular Dynamics, Amersham), wobei jeweils Veränderungen der Bandendichte in Relation zum Standard (Inkubation mit BA des Vollbluts der jeweiligen Versuchsperson) angegeben wurden.

2.4. Statistik

Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe von SPSS für Windows 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Illi-

nois, USA) ausgeführt. Zum statistischen Vergleich der Mittelwerte bei den unterschiedlichen Versuchsgruppen wurde ein nichtparametrischer Test (Mann-Whitney-Test) verwendet, beziehungsweise beim Vergleich der Kortisolinhibitionswerte ein gepaarter Wilcoxon-Test, da es sich hierbei um verbundene Stichproben handelte. Die Tabellen wurden mit Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA), die Grafiken mit Sigma Plot für Windows 8.0 (SPSS Inc.) und das Textdokument mit Word 2003 (Microsoft Corporation, USA) angefertigt. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Zytokinsekretion

Zunächst wird der Effekt der Vorinkubation mit Testosteron, E2, beziehungsweise ohne Hormon, betrachtet. Gemessen wurden oben genannte 6 Zytokine. Genormt wurden die Sekretionen jeweils am Wert der Kontrolle, das heißt der Vorinkubation ohne Hormon, welcher 100 Prozent darstellt.

3.1.1. Interleukin 6

Unter LPS-Stimulation und dem Vorhandensein von 10^{-6} mol/l Kortisol fand sich für IL-6 eine signifikant höhere Sekretion unter 10^{-9} und 10^{-10} mol/l E2 (Abb. 5). Unterschiede ergaben sich ebenfalls beim Vergleich der 10^{-9} und 10^{-10} mol/l E2-vorinkubierten Proben zu den mit Testosteron vorbehandelten Proben.

Bei der Betrachtung der IL-6 Ausschüttung ohne Zusatz von Kortisol fanden sich lediglich hochsignifikante Unterschiede bei 10^{-9} und 10^{-10} mol/l E2 im Vergleich zur Kontrolle, und beim Vergleich der 10^{-9} und 10^{-10} mol/l E2-vorinkubierten Proben mit beiden Proben unter Testosteroneinfluss.

Die folgende Abbildung zeigt die einzelnen Ergebnisse:

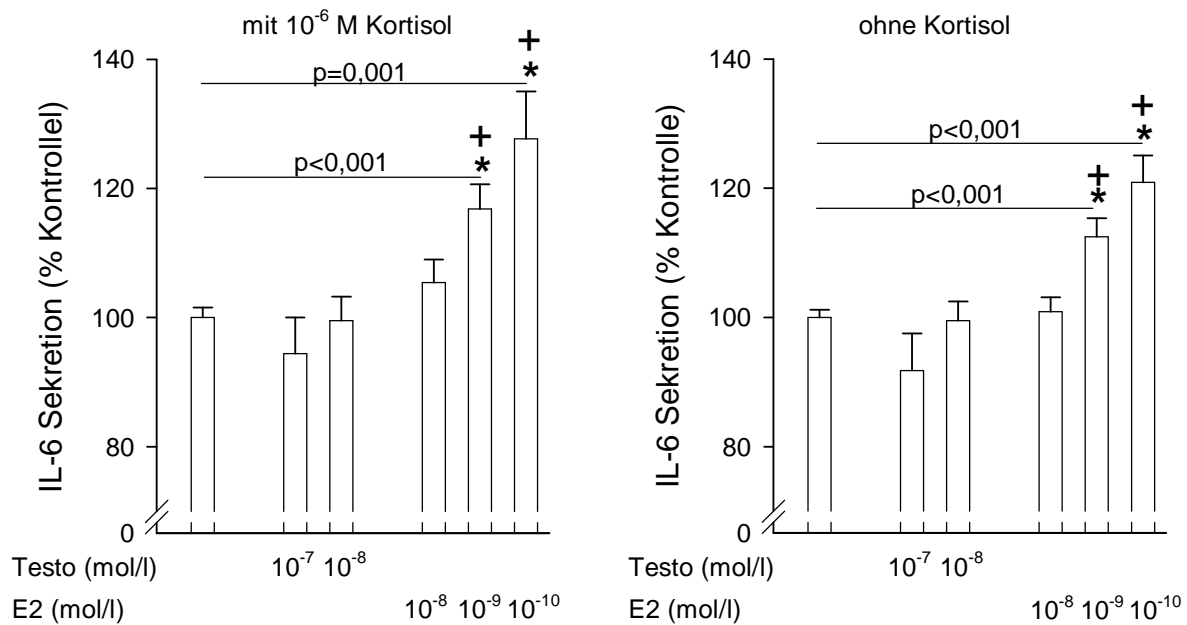


Abbildung 5: Interleukin 6 (IL-6)-Sekretion unter LPS-Stimulation (0,5 ng/ml) und 10^{-6} mol/l Kortisol, beziehungsweise ohne Kortisol nach 12h und jeweils 24 stündiger Vorinkubation mit Testosteron (Testo) 10^{-7} , 10^{-8} , 17β -Östradiol (E2) 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/l im Vergleich zur Trägersubstanz (Benzylalkohol = Kontrolle, vorangestellter Balken). * $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-7} mol/l; + $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-8} mol/l.

3.1.2. Interferon gamma

Beim Vergleich der $IFN\gamma$ -Werte fanden sich unter Kortisolzusatz (10^{-6} mol/l) keine signifikanten Unterschiede.

Ohne Zugabe von Kortisol ergab sich eine niedrigere $IFN\gamma$ -Sekretion unter beiden verwendeten Testosteronkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 6). Des Weiteren ergaben sich Unterschiede bei der Betrachtung von E2 10^{-9} und 10^{-10} mol/l im Vergleich zu 10^{-8} mol/l Testosteron.

In nachfolgender Abbildung sind die Ergebnisse detailliert dargestellt:

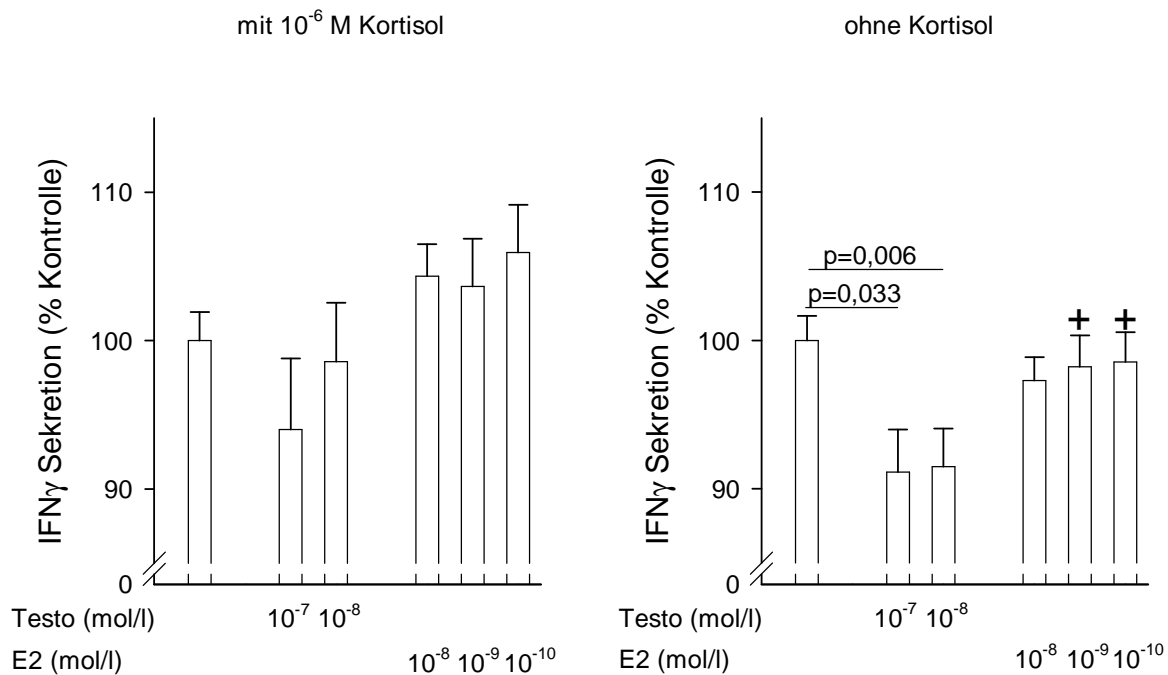


Abbildung 6: Interferon gamma (IFN γ)-Sekretion unter Concanavalin A-Stimulation (100 μ g/ml) und Kortisol 10^{-6} mol/l, beziehungsweise ohne Kortisol nach 24 Stunden und jeweils 24 stündiger Vorinkubation mit Testosteron (Testo) 10^{-7} , 10^{-8} , 17β -Östradiol (E2) 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/l im Vergleich zur Trägersubstanz (Benzylalkohol = Kontrolle, vorangestellter Balken). + $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-8} mol/l.

3.1.3. Interleukin 4

Unter Einfluss von 10^{-6} mol/l Kortisol ergaben sich auch für die IL-4-Sekretion keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7).

Bei Betrachtung der Daten ohne Kortisolzusatz ergab sich ein signifikant niedrigerer IL-4-Wert unter 10^{-8} mol/l Testosteron im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 7). Bei 10^{-9} und 10^{-10} mol/l E2 ergaben sich höhere Werte im Vergleich zu beiden Testosteronkonzentrationen (Abb. 7).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

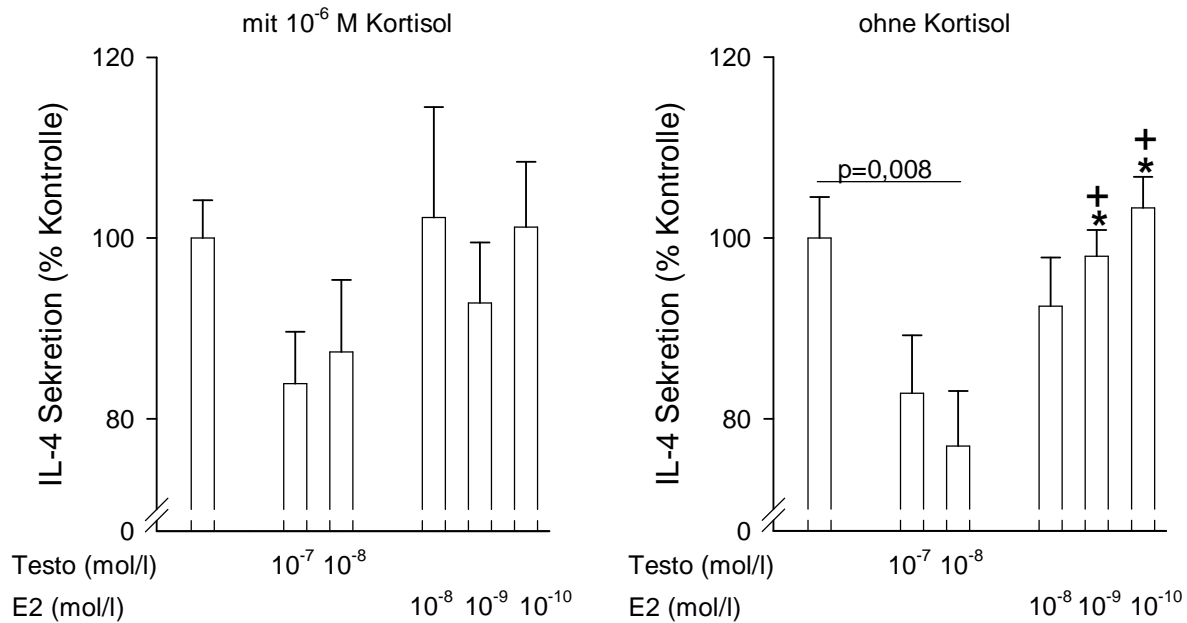


Abbildung 7: Interleukin 4 (IL-4)-Sekretion unter Concanavalin A-Stimulation (100µg/ml) und Kortisol 10⁻⁶ mol/l, beziehungsweise ohne Kortisol nach 24 Stunden und jeweils 24 stündiger Vorinkubation mit Testosteron (Testo) 10⁻⁷, 10⁻⁸, 17β-Östradiol (E2) 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ mol/l im Vergleich zur Trägersubstanz (Benzylalkohol = Kontrolle, vorangestellter Balken). * p<0,05 im Vergleich zu Testo 10⁻⁷ mol/l; + p<0,05 im Vergleich zu Testo 10⁻⁸ mol/l.

3.1.4. Interleukin 10

Bei Zugabe von 10⁻⁶ mol/l Kortisol ergab sich lediglich eine niedrigere IL-10-Sekretion unter Testosteron in einer Konzentration von 10⁻⁸ mol/l im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8).

Ohne Kortisolzusatz fand sich ein signifikant niedrigerer IL-10-Wert für Testosteron 10⁻⁷ mol/l im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8), sowie für Testosteron in einer Konzentration von 10⁻⁷ mol/l im Vergleich zu E2 in einer Konzentration von 10⁻⁹ und 10⁻¹⁰ mol/l (Abb. 8).

In nachfolgender Abbildung sind die Ergebnisse im Einzelnen dargestellt:

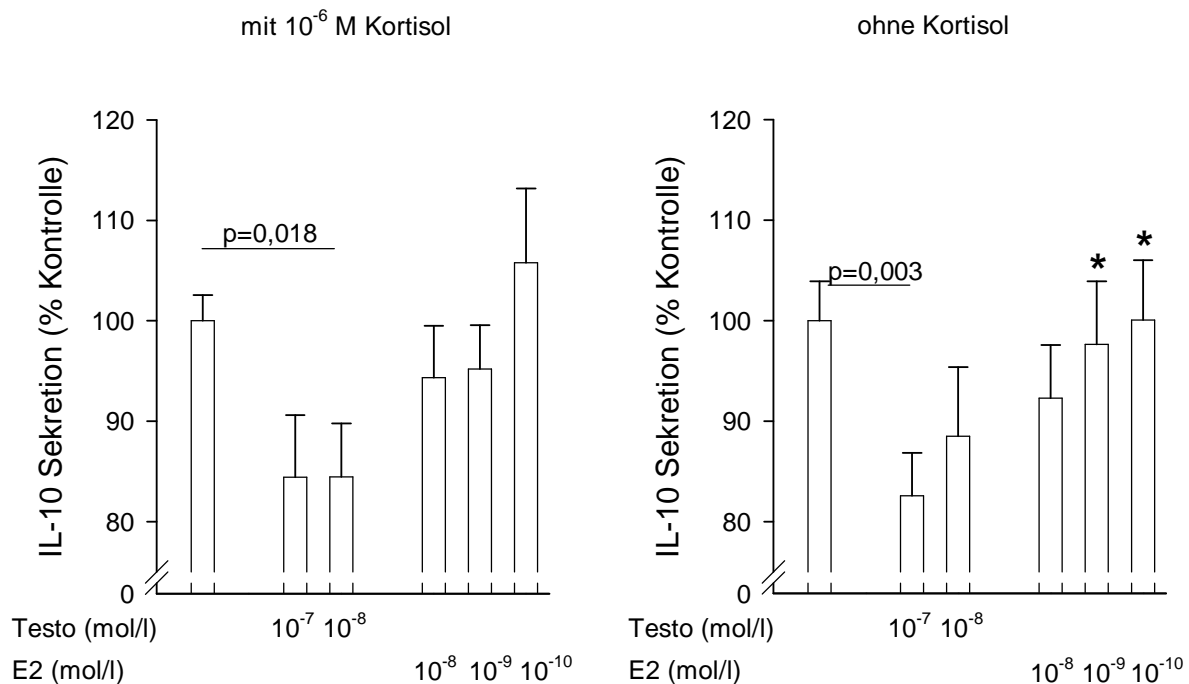


Abbildung 8: Interleukin 10 (IL-10)-Sekretion unter Concanavalin A-Stimulation ($100\mu\text{g/ml}$) und Kortisol 10^{-6} mol/l, beziehungsweise ohne Kortisol, nach 12 Stunden und jeweils 24 stündiger Vorinkubation mit Testosteron (Testo) 10^{-7} , 10^{-8} , 17β -Östradiol (E2) 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/l im Vergleich zur Trägersubstanz (Benzylalkohol = Kontrolle, vorangestellter Balken). * $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-7} mol/l.

3.1.5. Tumor-Nekrose-Faktor alpha

Im Vergleich zur Kontrolle waren unter Kortisolzusatz keine unterschiedlichen $\text{TNF}\alpha$ -Sekretionen festzustellen. Es fand sich ein Unterschied lediglich für E2 in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l im Vergleich zu 10^{-8} mol/l Testosteron (Abb. 9).

Ohne Kortisol waren die Werte bei Vorinkubation mit Testosteron 10^{-8} mol/l sowie E2 10^{-9} mol/l signifikant niedriger als bei der Kontrolle. Darüber hinaus waren die Werte unter Testosteron 10^{-7} mol/l niedriger als bei E2 10^{-10} mol/l und unter Testosteron 10^{-8} mol/l niedriger als bei 10^{-8} und 10^{-10} mol/l E2.

Die nächste Abbildung zeigt die Ergebnisse:

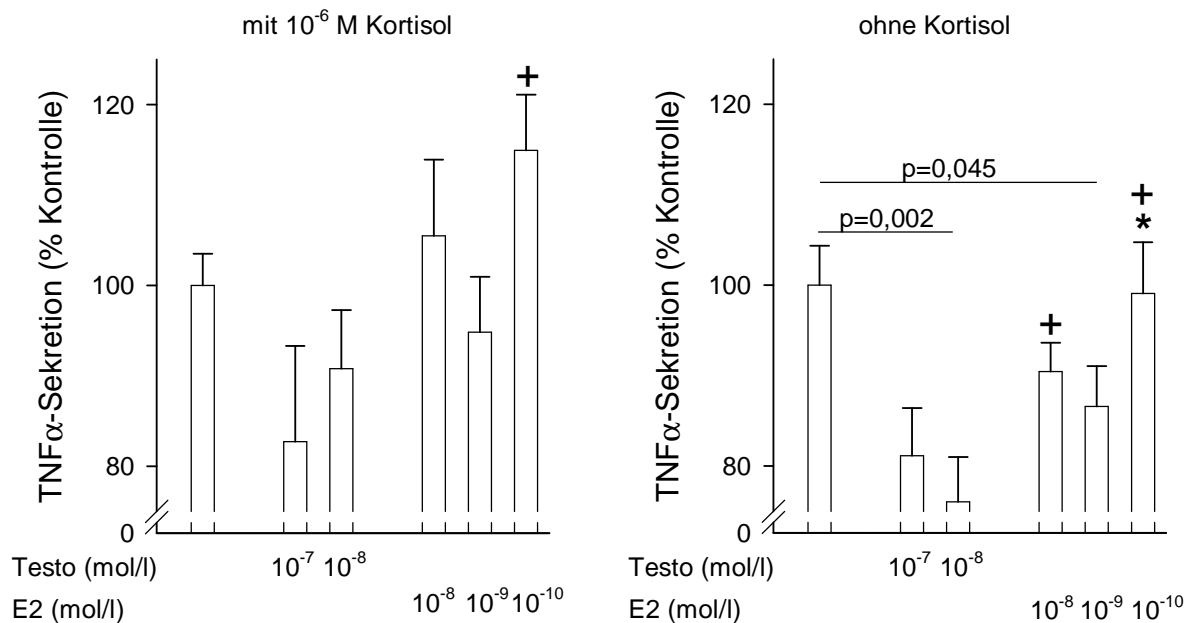


Abbildung 9: Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNFα)-Sekretion unter Concanavalin A-Stimulation (100µg/ml) und Kortisol 10⁻⁶ mol/l, beziehungsweise ohne Kortisol, nach 12 Stunden und jeweils 24 stündiger Vorinkubation mit Testosteron (Testo) 10⁻⁷, 10⁻⁸, 17β-Östradiol (E2) 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ mol/l im Vergleich zur Trägersubstanz (Benzylalkohol = Kontrolle, vorangestellter Balken). * p<0,05 im Vergleich zu Testo 10⁻⁷ mol/l; + p<0,05 im Vergleich zu Testo 10⁻⁸ mol/l.

3.1.6. Interleukin 2

Bei Zusatz von 10⁻⁶ mol/l Kortisol ergaben sich für die IL-2-Sekretion niedrigere Werte unter 10⁻⁷ mol/l Testosteron im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10). Die Vorinkubation mit E2 erbrachte höhere Werte für IL-2 bei 10⁻⁸, 10⁻⁹ und 10⁻¹⁰ mol/l im Vergleich zu 10⁻⁷ mol/l Testosteron (Abb. 10).

Bei Betrachtung der IL-2-Werte ohne Kortisolzugabe fand sich eine niedrigere Produktion unter Testosteron 10⁻⁷ mol/l und 10⁻⁸ mol/l im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10). Testosteron

10^{-8} mol/l bewirkte einen niedrigeren Wert im Vergleich zu E2 in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l (Abb. 10).

Nachfolgende Abbildung zeigt die detaillierten Ergebnisse:

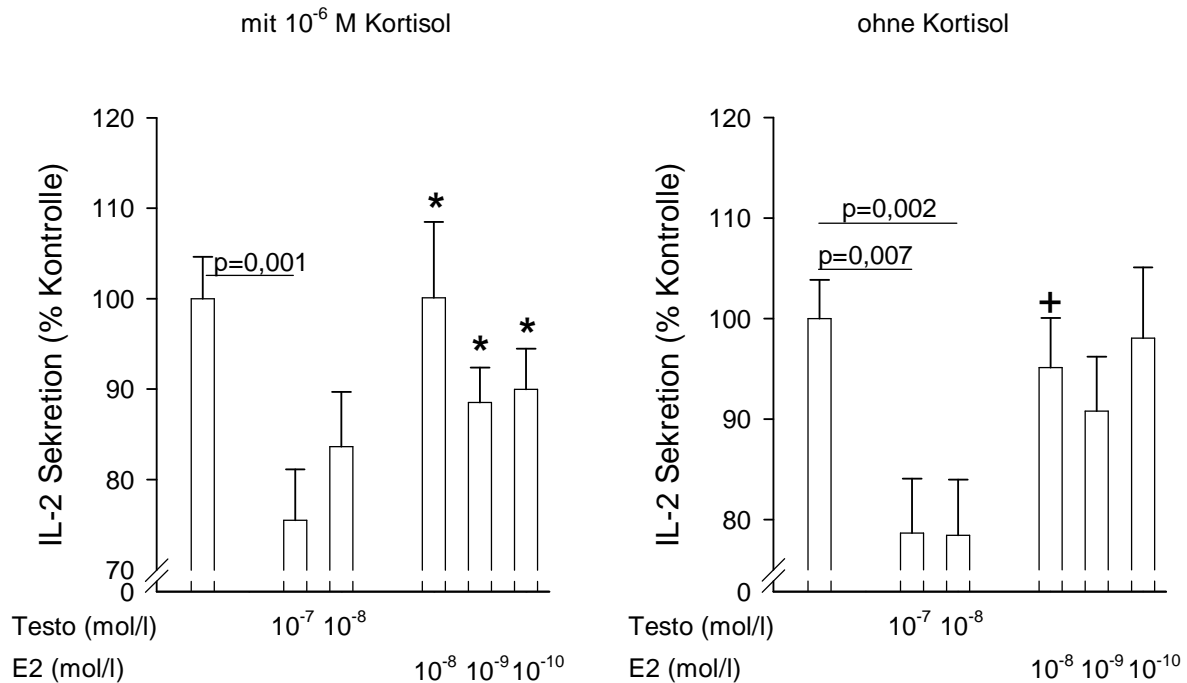


Abbildung 10: Interleukin 2 (IL-2)-Sekretion unter Concanavalin A-Stimulation ($100\mu\text{g/ml}$) und Kortisol 10^{-6} mol/l, beziehungsweise ohne Kortisol, nach 24 Stunden und jeweils 24 stündiger Vorinkubation mit Testosteron (Testo) 10^{-7} , 10^{-8} , 17β -Östradiol (E2) 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/l im Vergleich zur Trägersubstanz (Benzylalkohol = Kontrolle, vorangestellter Balken). * $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-7} mol/l; + $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-8} mol/l.

3.2. Kortisolwirkung auf die Zytokinsekretion

Als Nächstes soll der Effekt von Kortisol auf die Zytokinsekretion betrachtet werden. Hierbei könnten mögliche Unterschiede in der Kortisolwirkung nach vorheriger Hormoninkubation gezeigt werden.

Als Darstellung eignet sich die Verwendung der Kortisolinhibition $[(\text{Wert}_{\text{ohne_Kortisol}} - \text{Wert}_{\text{Kortisol}}) / \text{Wert}_{\text{ohne_Kortisol}}]$, das heißt der Prozentsatz, um den die Sekretion des Zytokins unter Kortisolzugabe niedriger ist als ohne Kortisol. Negative Werte bedeuten demnach, dass der Wert unter Kortisol höher als ohne Kortisolbehandlung ist.

3.2.1. Interleukin 6

Für die Hemmung der IL-6-Sekretion durch Kortisol ergaben sich keine signifikanten Unterschiede durch die unterschiedlichen Vorinkubationen.

Die Hemmung der IL-6-Werte durch Kortisol in Relation zur Kontrolle bewegte sich zwischen 7 und 10 Prozent.

In der folgenden Abbildung sind die genauen Werte dargestellt:

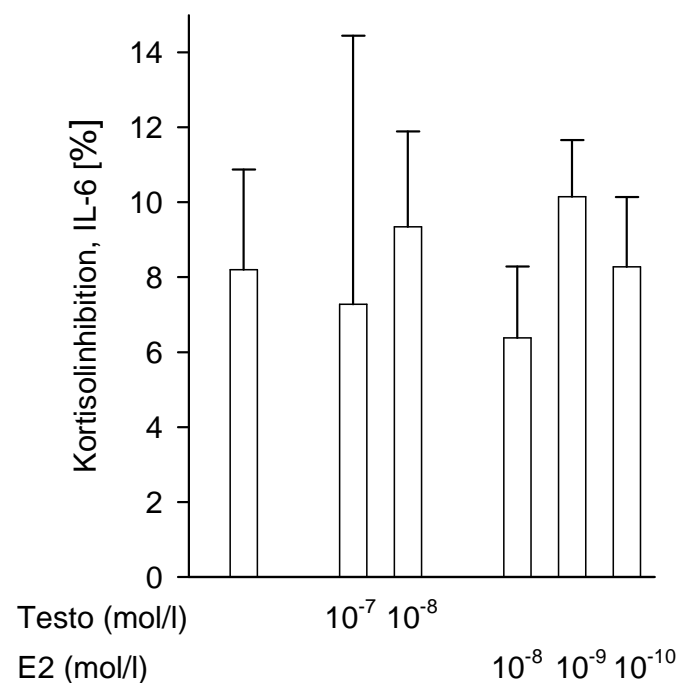


Abbildung 11: Hemmung der IL-6-Sekretion durch Zugabe von 10^{-6} mol/l Kortisol, bezogen auf den Kontrollwert (ohne Kortisol) für die jeweilige Vorinkubation, in Prozent. Der vorangestellte Balken stellt die Kontrolle dar (Vorinkubation ohne Hormon).

Testo = Testosteron, E2 = 17 β -Östradiol

3.2.2. Interferon gamma

Bei der Betrachtung bezüglich der Unterschiede in der Hemmung der IFN γ -Sekretion durch Kortisol bei 10^{-6} mol/l fand sich lediglich eine Tendenz zur niedrigeren Hemmung bei Vorinkubation mit 10^{-8} mol/l E2 im Vergleich zur Kontrolle, die jedoch nicht signifikant scheint (siehe Abb. 12).

Die Hemmung der IFN γ -Sekretion durch Kortisol lag etwa zwischen 13 und 22 Prozent.

In nachfolgender Abbildung sind die Werte der Inhibition durch Kortisol für IFN γ dargestellt:

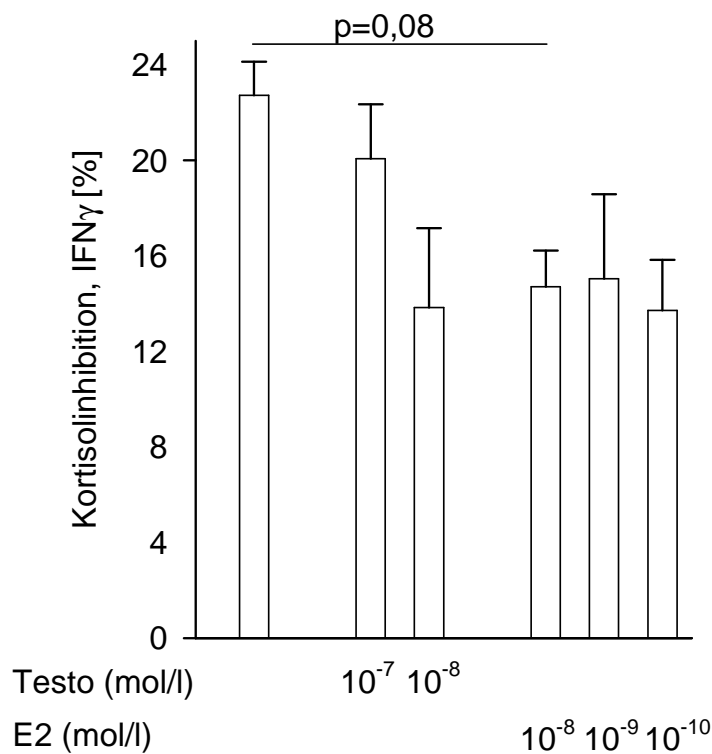


Abbildung 12: Hemmung der IFN γ -Sekretion durch Zugabe von 10^{-6} mol/l Kortisol, bezogen auf den Kontrollwert (ohne Kortisol) für die jeweilige Vorinkubation, in Prozent. Der vorangestellte Balken stellt die Kontrolle dar (Vorinkubation ohne Hormon).

Testo = Testosteron, E2 = 17 β -Östradiol

3.2.3. Interleukin 4

Es finden sich auch hier keine Unterschiede in der Kortisolwirkung auf das IL-4.

Die Hemmung durch Kortisol lag zwischen –2 und 18 Prozent.

Folgende Abbildung zeigt die genauen Werte:

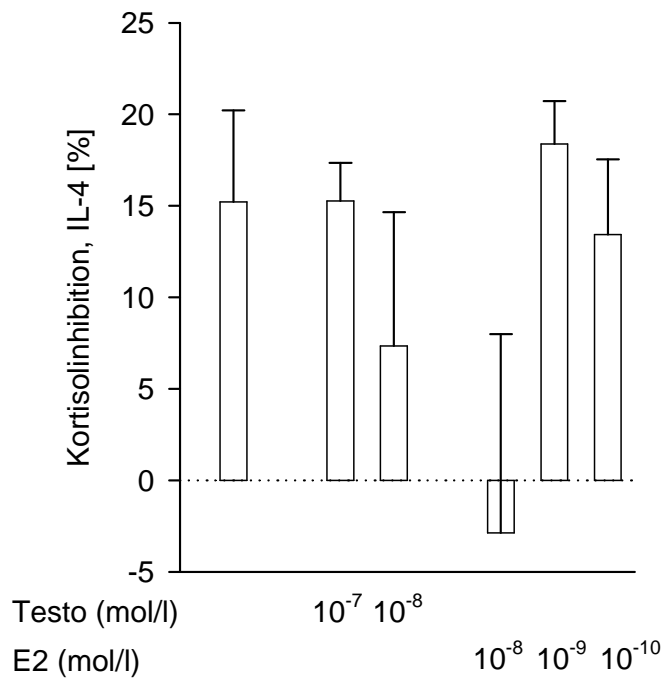


Abbildung 13: Hemmung der IL-4-Sekretion durch Zugabe von 10^{-6} mol/l Kortisol, bezogen auf den Kontrollwert (ohne Kortisol) für die jeweilige Vorinkubation, in Prozent. Der vorangestellte Balken stellt die Kontrolle dar (Vorinkubation ohne Hormon).

Testo = Testosteron, E2 = 17β -Östradiol

3.2.4. Interleukin 10

Die Hemmung der IL-10-Sekretion durch Kortisol unterlag durch die hohen Streuungen keinen signifikanten Unterschieden.

Die Hemmungswerte lagen zwischen –2 und 7 Prozent.

In der folgenden Grafik sind die Werte abgebildet:

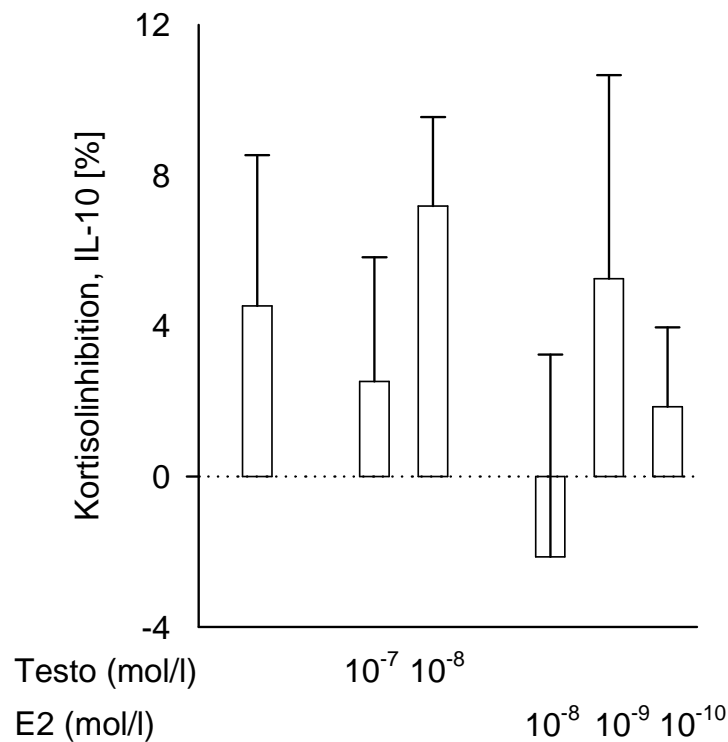


Abbildung 14: Hemmung der IL-10-Sekretion durch Zugabe von 10^{-6} mol/l Kortisol, bezogen auf den Kontrollwert (ohne Kortisol) für die jeweilige Vorinkubation, in Prozent. Der vorangestellte Balken stellt die Kontrolle dar (Vorinkubation ohne Hormon).
Testo = Testosteron, E2 = 17β -Östradiol

3.2.5. Tumor-Nekrose-Faktor alpha

Die Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion durch die Zugabe von 10^{-6} mol/l Kortisol war bei Vorinkubation mit 10^{-8} mol/l Testosteron niedriger im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15). Des Weiteren bewirkte die Vorbehandlung mit 10^{-8} mol/l E2 eine niedrigere Hemmung als mit 10^{-7} mol/l Testosteron (Abb. 15).

Die Inhibition für $\text{TNF}\alpha$ unter Kortisol lagen zwischen 5 und 29 Prozent.

Die detaillierten Ergebnisse sind folgender Abbildung zu entnehmen:

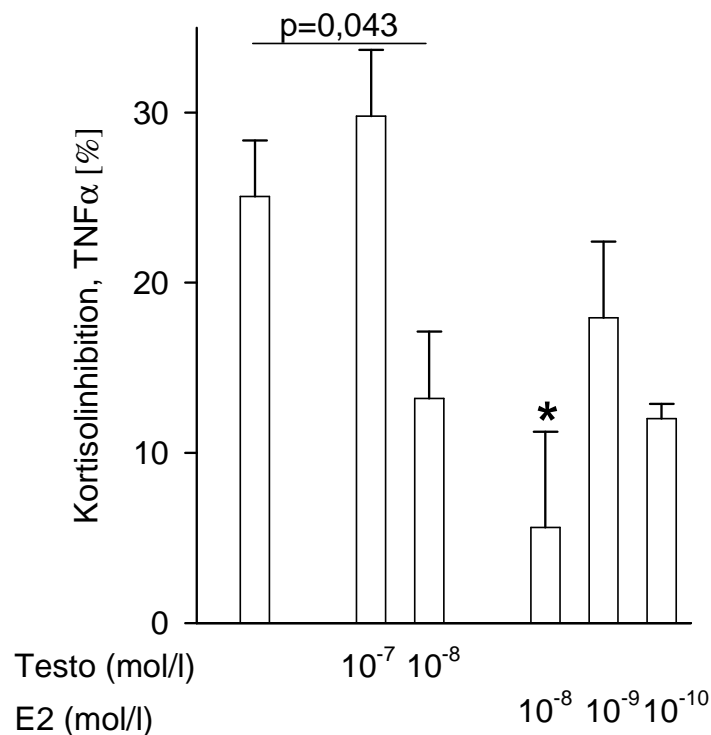


Abbildung 15: Hemmung der TNF α -Sekretion durch Zugabe von 10⁻⁶ mol/l Kortisol, bezogen auf den Kontrollwert (ohne Kortisol) für die jeweilige Vorinkubation, in Prozent. Der vorangestellte Balken stellt die Kontrolle dar (Vorinkubation ohne Hormon). Testo = Testosteron, E2 = 17 β -Östradiol. * p<0,05 im Vergleich zu Testo 10⁻⁷ mol/l.

3.2.6. Interleukin 2

Für die Hemmung der IL-2-Sekretion unter Kortisol gab es keinen Anhalt für Unterschiede bei den verschiedenen Gruppen.

Die IL-2-Ausschüttung wurde in unserem Versuchsansatz durch Kortisol zwischen 12 und 25 Prozent gemindert.

Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung ersichtlich:

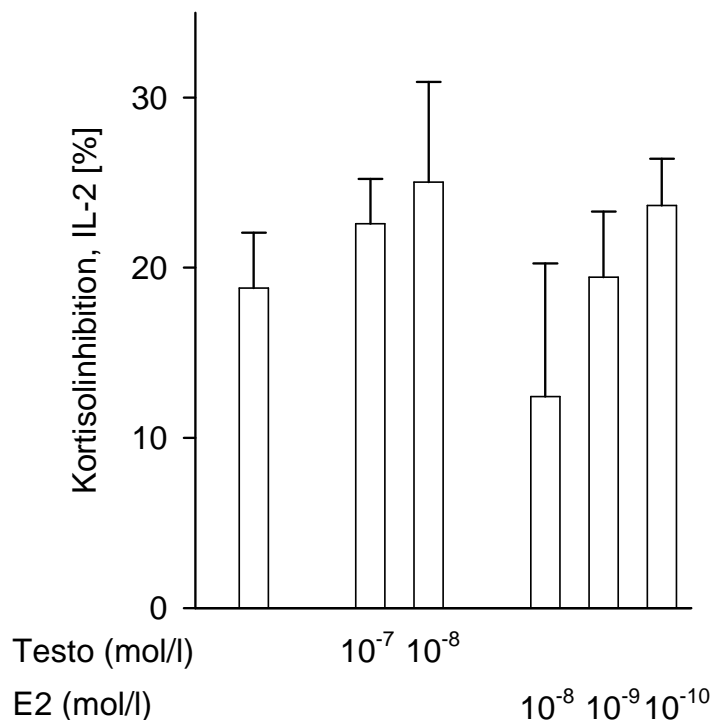


Abbildung 16: Hemmung der IL-2-Sekretion durch Zugabe von 10^{-6} mol/l Kortisol, bezogen auf den Kontrollwert (ohne Kortisol) für die jeweilige Vorinkubation, in Prozent. Der vorangestellte Balken stellt die Kontrolle dar (Vorinkubation ohne Hormon).
Testo = Testosteron, E2 = 17β -Östradiol

3.3. Quotient aus Interferon gamma und Interleukin 4

Die Betrachtung des Verhältnisses zwischen $\text{IFN}\gamma$ und IL-4 ist deshalb wichtig, da beide Zytokine eine wichtige Rolle bei der Differenzierung des Immunsystems zu einer Th1 ($\text{IFN}\gamma$)- beziehungsweise Th2 (IL-4) -Antwort spielen. Somit bedeutet ein höherer Quotient ein mögliches Überwiegen einer Th1-Reaktion, ein niedrigerer Quotient eine möglich stärkere Th2-Entwicklung.

3.3.1. Unter Kortisolzugabe

Für den $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$ -Quotienten ergaben sich höhere Werte bei Vorinkubation mit Testosteron sowie für 10^{-9} mol/l E2 im Vergleich zur Kontrolle (Abb.17). Bemerkenswert ist die Steigerung des Quotienten auf Werte von 112 bis 128 Prozent der Kontrolle.

Die Werte sind in der Abbildung unten grafisch dargestellt:

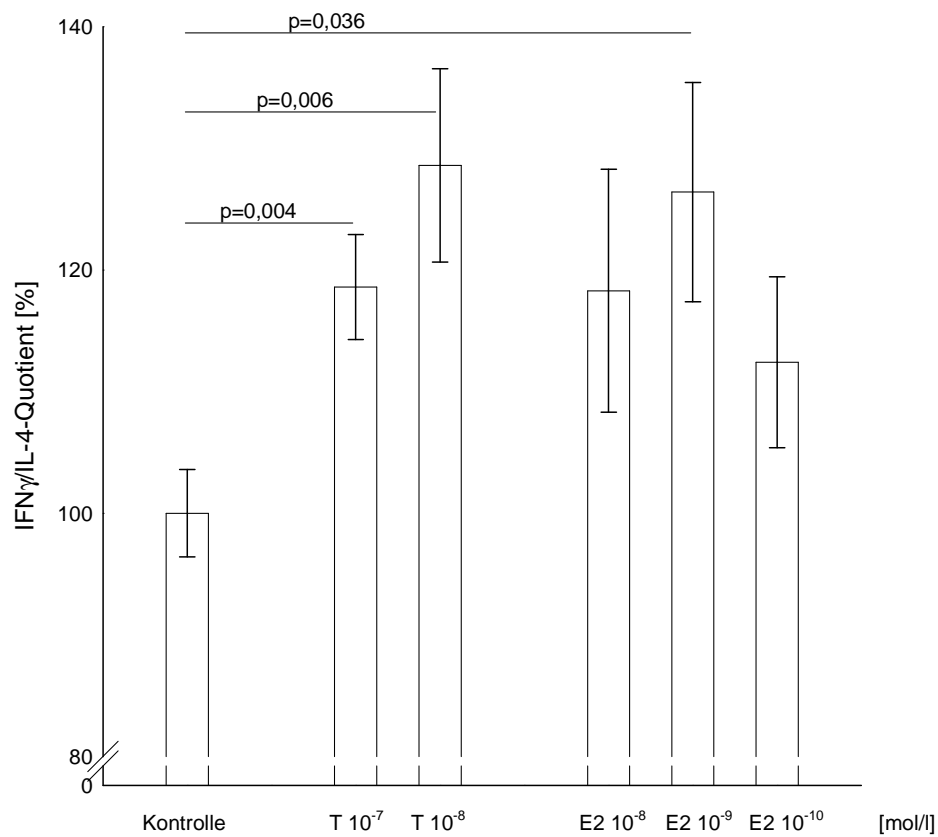


Abbildung 17: $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$ -Quotient, angegeben in Prozent der Kontrolle (Vorinkubation ohne Hormon = 100%, vorangestellter Balken), unter Kortisolzugabe (10^{-6} mol/l).

T = Testosteron; E2 = 17β -Östradiol

3.3.2. Ohne Kortisolzugabe

Ohne Kortisolzusatz fand sich eine tendenzielle Steigerung des IFN γ /IL-4-Quotienten für Vorbehandlung mit Testosteron in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l in Relation zur Kontrolle, sowie eine Erniedrigung des Quotienten für 10^{-10} mol/l E2 im Vergleich zu den Werten bei beiden Testosteronkonzentrationen (Abb. 18). Die Werte für den Quotienten betrugen 94 bis 122 Prozent der Kontrolle.

Nachfolgende Abbildung zeigt die gesamten Werte:

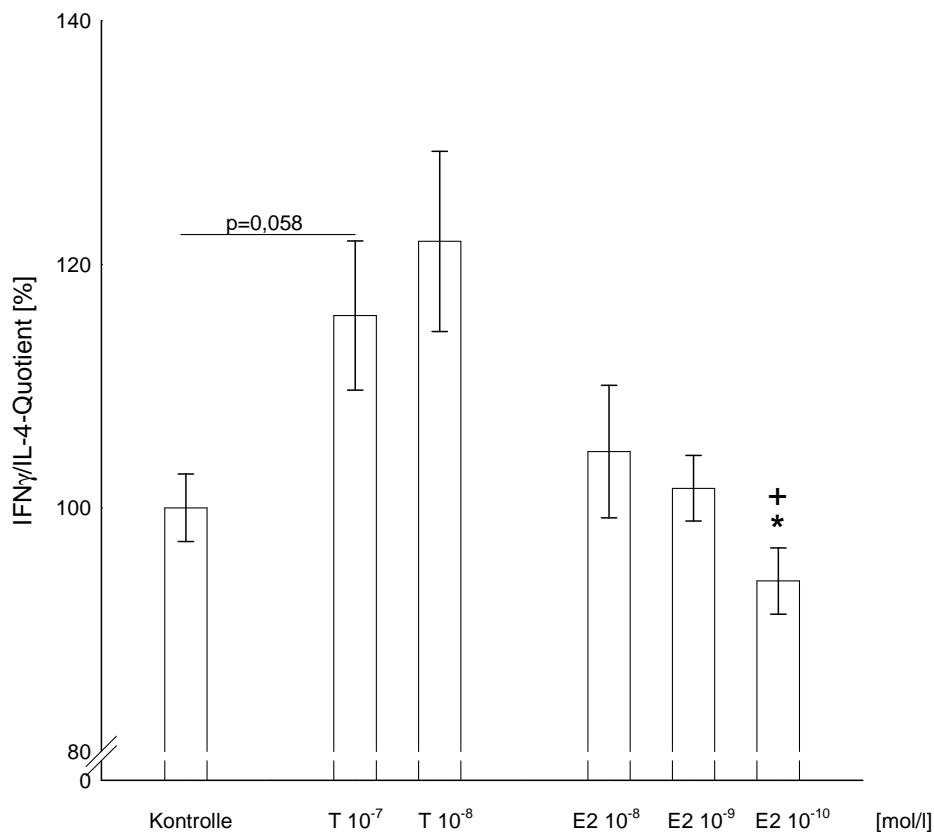


Abbildung 18: IFN γ /IL-4-Quotient, angegeben in Prozent der Kontrolle (Vorinkubation ohne Hormon = 100%, vorangestellter Balken), ohne Kortisolzugabe. T = Testosteron; E2 = 17β -Östradiol. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-7} mol/l; + $p < 0,05$ im Vergleich zu Testo 10^{-8} mol/l.

3.3.3. Direkter Vergleich Kortisol - kein Kortisol

Der direkte Vergleich der Verhältnisse von IFN γ und IL-4, sowohl unter Kortisoleinfluss, als auch ohne Zugabe von Kortisol, soll auch hier einen möglichen Einfluss der Interaktion von Testosteron beziehungsweise E2 (durch die Vorinkubation) mit Kortisol aufzeigen. Verglichen wurden die jeweiligen Wertepärchen *Kortisol/kein Kortisol* der Absolutwerte für den IFN γ /IL-4-Quotienten.

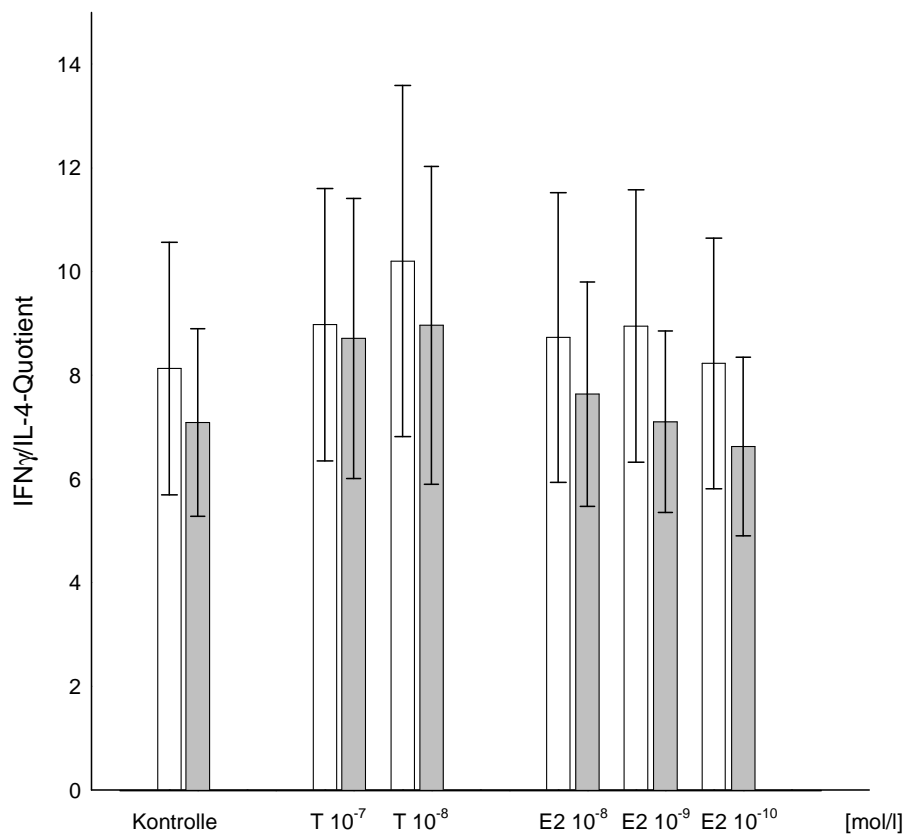


Abbildung 19: Direkter Vergleich IFN γ /IL-4-Quotient (Absolutwerte) unter 10^{-6} mol/l Kortisolzugabe (weiße Balken) und ohne Kortisolzugabe (graue Balken). Die beiden vorangestellten Balken entsprechen der Kontrolle (Vorinkubation ohne Hormon).

T = Testosteron; E2 = 17 β -Östradiol.

Bedingt durch die relativ großen Streuungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kortisolzusatz beziehungsweise kein Kortisolzusatz, wenngleich die Mittelwerte bei Kortisolzusatz allesamt höher als bei den Gruppen ohne Kortisolzugabe waren.

Die Werte für den Quotienten betrugen in den Experimenten zwischen 7 und 10.

3.4. Expression des humanen Glukokortikoidrezeptors

Als Letztes sollte anhand des Nachweises des hGR mittels Westernblot-Technik eine denkbare Ursache für eine mögliche Interaktion zwischen hormoneller Vorinkubation mit Testosteron oder E2 und nachfolgender Behandlung mit Glukokortikoiden gezeigt werden. Die zugrundegelegte Hypothese war, dass E2 möglicherweise zu einer erniedrigten Expression des hGR führt, und somit zu einem Wirkungsverlust des Kortisols. Als Hormonkonzentrationen für die aufwendigen Experimente wurden Testosteron 10^{-7} , E2 10^{-8} und 10^{-10} mol/l gewählt, da hier der größte Effekt bei der Zytokinsekretion beobachtet werden konnte.

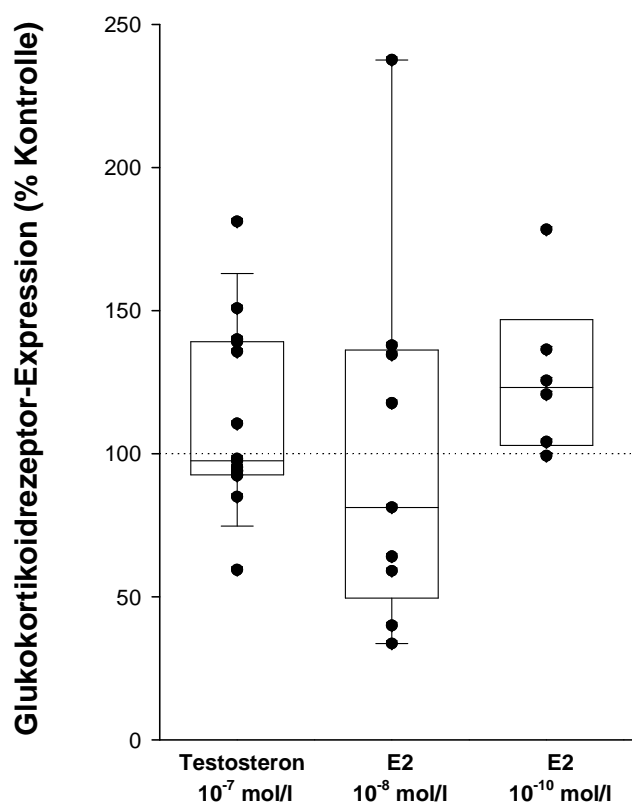


Abbildung 20: Expression des humanen Glukokortikoidrezeptors bei 24 Stunden Vorinkubation mit Testosteron 10^{-7} , 17β -Östradiol 10^{-8} und 10^{-10} mol/l, in Relation zur Kontrolle (24 Stunden Inkubation mit Benzylalkohol) als Prozent angegeben. Die Daten wurden densitometrisch aus den Westernblots bestimmt. Die Boxen bestehen von oben nach unten aus folgenden horizontalen Linien: 75.Perzentile, Median, 25.Perzentile. Die überstehenden Markierungen kennzeichnen die 95. beziehungsweise 5.Perzentile. Die Werte der Einzelmessungen sind als Punkte dargestellt. E2 = 17β -Östradiol

Im Hinblick auf die Expression des hGR fanden sich keine Hinweise für eine Zu- oder Abnahme desselben unter Einfluss von Testosteron in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l, beziehungsweise E2 in einer Konzentration von 10^{-8} und 10^{-10} mol/l.

4. Diskussion

Bei der Betrachtung direkter Testosteroneffekte auf die Zytokinsekretion können zunächst folgende Aussagen getätigt werden: Nach 24 stündiger Vorinkubation mit Testosteron kam es zu einer erniedrigten Zytokinsekretion, welche sich für IFN γ ohne Kortisolzusatz, IL-2 ohne Kortisol und teilweise auch für IL-4 ohne Kortisol, IL-10 mit und ohne Kortisol, TNF α ohne Kortisol und IL-2 mit Kortisol signifikant zeigte. In der Literatur wurde eine verminderte Zytokinsekretion unter Testosteroneinfluss bereits vielfach beschrieben, unter anderem wurde eine Abnahme des IL-1, IL-2, IL-4 und des IFN γ (59-63) nachgewiesen. Man beobachtete zudem eine Zunahme der Aktivität der CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen und Suppressor-T-Zellen, sowie eine Abnahme der peripheren B-Zellen und deren Antikörperproduktion (57,58). Daraus könnte sich ein Erklärungsansatz für die günstige Beeinflussung T- und B-Zell-vermittelter Autoimmunkrankheiten durch Androgene ergeben (46,47,63).

Unter dem Einfluss von E2 (durch 24 stündige Vorinkubation) in physiologischen Konzentrationen kam es unter Stimulationsbedingungen mit LPS, sowohl mit Kortisolzusatz als auch ohne, zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Sekretion für die beiden niedrigen E2-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. Für die übrigen Zytokine ergab sich lediglich eine Tendenz zur gesteigerten Sekretion, welche in diesem Versuchsansatz kein ausreichendes Signifikanzniveau erreichte (Kriterium $p < 0,05$). In den meisten Fällen ergab sich auch ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Zytokinwerte für E2 zu denen mit Testosteronvorinkubation (IL-6, IL-4 ohne Kortisol, teilweise bei IFN γ ohne Kortisol, IL-10 ohne Kortisol, TNF α und IL-2), wobei auch hier die Tendenz ersichtlich wird, dass die Unterschiede unter der höchsten verwendeten E2-Konzentration am geringsten ausfallen, beziehungsweise gar nicht mehr vorhanden sind. Für die Wirkung der Östrogene kommen mehrere Wirkmechanismen in Betracht. Zunächst muss die Art des Stimulus betrachtet werden. Unter Stimulation mit LPS konnte eine Hemmung der TNF-Produktion von peripheren mononukleären Zel-

len (PBMC), bei fehlendem Stimulus ein stimulierender Effekt gezeigt werden (102). Im Gegensatz zeigte sich im Vollblutassay durch Rogers et al 2001 unter E2 in einer Konzentration von 10^{-10} bis 10^{-8} mol/l eine Verringerung der spontanen Sekretion von IL-6, TNF α , IL-1 α und IL-1 β , aber keine wesentliche Änderung unter einer hohen Stimulation mit 500 ng/ml LPS. In mehreren Arbeiten konnte klar nachgewiesen werden, dass E2 die Antikörperproduktion durch B-Zellen stimulieren kann (66,103,104), vermutlich durch eine verminderte T-Zell vermittelte B-Zell-Hemmung (48). Im Gegensatz konnte eine Hemmung von B-Lymphozyten-Vorläuferzellen unter hohen E2-Konzentrationen (während der Schwangerschaft) gezeigt werden (105). Hier zeigt sich einerseits der unterschiedliche Einfluss der Östrogene auf verschiedene Zelltypen (B-Zelle/T-Zelle) und Zelluntergruppen (B-Vorläuferzelle versus B-Zelle), andererseits eine klare Abhängigkeit der verwendeten beziehungsweise vorliegenden Konzentrationen. Dies zeigt sich zumindest auch ansatzweise in den Ergebnissen dieser Arbeit, bei Betrachtung der Unterschiede E2-/Testosteron-Vorinkubation. Hier fielen die Unterschiede durchgehend jeweils am geringsten bei der höchsten verwendeten E2-Konzentration aus. Weiterhin wichtig für die Östrogenwirkung ist das Verhältnis der Rezeptorsubtypen ER α und ER β . Hier konnte eine veränderte Wirkung von E2 durch Überwiegen eines Rezeptorsubtyps (ER α oder ER β) nachgewiesen werden (106,107). Als möglicher Mechanismus wurde eine verringerte Transkription von ER α durch ER β als Modulator postuliert (106). Als Effekt konnte beispielsweise eine durch ER α -Stimulation vermittelte IL-1-Sekretion durch ER β gehemmt werden (107). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Gesamtzahl der Glukokortikoidrezeptoren in entzündlichem Kontext abnimmt (108). Von entscheidender Bedeutung scheint auch der Zeitpunkt des Östrogeneinflusses im Zuge einer Entzündungsreaktion zu sein (48). Es zeigte sich während der chronischen Entzündungsphase (gekennzeichnet durch eine hohe Entzündungsaktivität und ein höheres Maß an Gewebshypoxie) ein Überwiegen von ER β im Vergleich zu ER α (109-111). Hieraus kann ein bedeutend

verändertes (womöglich ungünstigeres) Ansprechverhalten auf Östrogene abgeleitet werden (48). Die generelle Wichtigkeit des Zeitpunkts einer Behandlung konnte wirkungsvoll am Tiermodell der Kollageninduzierten Arthritis nachgewiesen werden (112,113), hier zeigte sich sogar eine klinische Verschlechterung bei später Intervention. Zuletzt ist die intrazelluläre Metabolisierung der Östrogene von wichtiger Bedeutung (48). Als relevante Metaboliten gelten 2-Hydroxy-Östrogen (2-OH-E2), 2-Methoxy-Östrogen (2-MeO-E2), 16-Hydroxy-Östrogen (16-OH-E2). Es konnten mehrfach wachstums- und entzündungshemmende Effekte von 2-OH-E2 und 2-MeO-E2 nachgewiesen werden (114-116), interessanterweise waren sowohl die meisten dieser Effekte unabhängig von Östrogenrezeptoren als auch die verwendeten Hormonkonzentrationen vergleichsweise hoch (10^{-7} bis 10^{-6} mol/l) (114-116). Im Tiermodell (oviarektomierte DBA/1-Mäuse) konnte 2-MeO-E2 die Entwicklung einer Typ 2- Kollagen-induzierten Arthritis unterdrücken (117). 16-OH-E2 scheint dagegen eher ungünstig bei der Entwicklung chronischer Entzündungen zu sein (48,118). Die relative Zunahme von 16-OH-E2 im Vergleich zu 2- und 4-Hydroxy-Östrogen (einem weiteren Metaboliten) kann insbesondere bei Betrachtung von Patienten mit Rheumatoider Arthritis als proinflammatorisches Zeichen gewertet werden (119).

In Hinsicht auf eine mögliche Verschiebung des Th1/Th2-Verhältnisses, in diesem Versuchsaufbau gemessen am Verhältnis des ausgeschütteten IFN γ zu IL-4, konnten Unterschiede nur unter Kortisoleinfluss gemessen werden. Bei Testosteronvorinkubation war das Verhältnis signifikant zugunsten des IFN γ und somit im Sinne einer Th1-Antwort verschoben. Unter E2-Einfluss konnte nur für die mittlere verwendete E2-Konzentration eine Tendenz zu einem gesteigerten IFN γ /IL-4-Quotienten gesehen werden, jedoch war das Ergebnis nicht signifikant, so dass dieser Unterschied als zufällig interpretiert werden darf. Ohne Kortisolzusatz fanden sich kaum signifikante Unterschiede, es ließen sich lediglich eine leichte Tendenz zu einem gesteigerten Th1/Th2-Verhältnis unter Testosteroneinfluss im Vergleich zur Kontrolle und ein schwach signifikant höheres Th1/Th2-Verhältnis im Vergleich zur niedrigsten ein-

gesetzten E2-Konzentration feststellen. Insgesamt sind die Effekte sehr gering ausgeprägt, nicht durchgehend und somit nicht aussagekräftig genug. In der Literatur hingegen finden sich viele Hinweise auf eine Beeinflussung des Th1-/Th2-Verhältnisses durch Geschlechtshormone (120,121). Insgesamt gibt es deutliche Hinweise für eine Beeinflussung durch E2 in Richtung einer Th2-Immunsierung (122-124). Generell wird dem Kortisol eine Verschiebung Richtung einer Th2-Immunsierung beigemessen (22). Weshalb die Testosteronvorinkubation nur bei Kortisolzusatz die Verschiebung zugunsten einer Th1-Antwort bewirken sollte, ist unklar. Die Tatsache, dass ohne Kortisolzusatz kein Effekt zu sehen ist, lässt vermuten, dass der Kortisoleffekt (Th2-Immunsierung) geringer ausfällt als ohne Vorinkubation mit Testosteron. Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus finden sich in der aktuellen Literatur nicht.

Hinsichtlich möglicher Interaktionen in der Wirkung von Testosteron beziehungsweise E2 mit Kortisol ergaben sich in diesem Versuchsansatz keine eindeutigen Beweise. Für die meisten Zytokine gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich einer verstärkten oder abgeschwächten Kortisolwirkung durch die unterschiedlichen Arten der Vorinkubation mit Testosteron beziehungsweise E2. Lediglich für TNF α konnten schwach signifikante Unterschiede in der Kortisolinhibition unter Einfluss von Testosteron in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l im Vergleich zur Kontrolle und unter Einfluss von E2 in einer Konzentration von 10^{-8} zu Testosteron 10^{-7} mol/l gefunden werden. Aufgrund der schwachen Signifikanz (p jeweils nur knapp unter 0,05) und des fehlenden Effekts bei sämtlichen anderen untersuchten Zytokinen muss hier am ehesten von einer zufälligen Genese ausgegangen werden.

Bei Gegenüberstellung der IFN γ /IL-4-Ratio unter Kortisol-, beziehungsweise ohne Kortisol einfluss ergaben sich ebenfalls keinerlei Unterschiede, so dass zusammenfassend die These einer möglichen Interaktion der geschlechtsspezifischen Hormone mit Kortisol in diesem Versuchsansatz widerlegt werden muss.

Daher konnten bei der Betrachtung des hGR als möglicher Ursache für eine veränderte Wirkung des Kortisols unter dem Einfluss sowohl weiblicher als auch männlicher Geschlechtshormone, welche anhand der Zytokindaten bereits widerlegt werden konnte, keine Unterschiede in der Zahl der Rezeptoren nach Vorinkubation mit den jeweiligen Hormonen gefunden werden. Somit kann die These der Regulation des hGR unter dem Einfluss von Testosteron beziehungsweise E2 in peripheren Zellen im Vollblutansatz in vitro in dieser Arbeit widerlegt werden.

Dennoch gibt es eindeutige Hinweise (48) auf mögliche Interaktionen, diese spielen sich jedoch nicht auf Ebene der peripheren Immunzellen ab. In Frage kommen unter anderem Interaktionen auf Ebene der HPA-Achse (48).

Wichtig hierbei sind die *folliculo-stellate cells* (FSC) der Hypophyse, weil sie erstens Makrophagen sind (125,126) und darüber hinaus im lokalen Milieu Zytokine produzieren und deshalb den Regelkreislauf beeinflussen können (127,128). Angenommen die FSC können ähnlich durch Testosteron und E2 beeinflusst werden, wie die peripheren Leukozyten im Vollblutassay, ergäbe das einen möglichen Erklärungsansatz für die Unterschiede im Ansprechverhalten der HPA-Achse (73-77,79,129) und der systemischen Kortisolsekretion (83,85-87,89,91) zwischen Frau und Mann.

Des Weiteren ist im Kontext eines übergeordneten Systems wie der HPA-Achse eine Beeinflussung regulierender Zellen auch auf der Ebene der Transkription denkbar. Dieses konnte bereits bei Fischen nachgewiesen werden, hier zeigte sich eine Interferenz auf Transkriptionsebene durch Kortisol, mit dem Effekt einer Hemmung der Vitellogenese durch Kortisol (130). Des Weiteren ist die Betrachtung weiterer Transkriptionsfaktoren wie des NF- κ B und des AP-1 wichtig (20,21,93,94). Eine Verringerung der NF- κ B-Aktivierung als entzündungshemmendes Signal findet sowohl unter E2-Einfluss ab einer Konzentration von 10^{-10} mol/l (131) als auch unter Kortisoleinfluss statt (21). Mögliche synergistische Effekte sind denkbar, dennoch bisher nicht beschrieben.

Einerseits haben hinsichtlich des E2 unterschiedliche Metaboliten unterschiedliche Wirkungen (s.o.) und spielen in der Pathogenese autoimmuner Krankheiten eine wichtige Rolle (132,133). Andererseits können Hormonspiegel und –wirkungen auch über den Abbau reguliert werden. Hier gibt es Hinweise für mögliche Interaktionen zwischen E2 und Kortisol auf Systemebene (134). Hier zeigte sich eine Hemmung der hepatischen Verstoffwechselung von Glukokortikoiden (via Hemmung der 11 β -Hydroxysteroid-Hydrogenase) durch Östrogene. Dies impliziert eine verstärkte Glukokortikoidwirkung durch Östrogene.

Es gibt auch Mechanismen, die zu einer möglichen Abschwächung der Glukokortikoidwirkung durch Rezeptormodifikation führen können. Beschrieben sind unter anderem eine Phosphorylierung des hGR im Zusammenhang mit der Entstehung von Glukokortikoidresistenz (135).

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich in dieser Arbeit zwar keine Interaktionen des Testosterons und des E2 bezüglich des Kortisoleffekts im humanen Vollblutassay in vitro finden lassen, sowie ebenfalls keine Wirkung der genannten Hormone auf die Zahl des hGR. Beide Geschlechtshormone haben eine Wirkung auf die Zytokinsekretion, Testosteron eher einen hemmenden, E2 eher einen stimulierenden oder stabilisierenden Effekt, insgesamt abhängig von vielen weiteren Faktoren. Dennoch lassen systemische Interaktionen Hoffnung für eine mögliche klinische Relevanz für an autoimmunen Krankheiten leidende Patienten keimen.

5. Zusammenfassung

Östrogene haben in physiologischen Konzentrationen eher einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem, Androgene hingegen eher einen hemmenden Einfluss. Die genaue Wirkung von Testosteron beziehungsweise E2 in Kombination mit Kortisol auf periphere Immunzellen ist hierbei noch weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurde zunächst die Wirkung einer 24-stündigen Vorinkubation mit Testosteron beziehungsweise E2 auf die Sekretion von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α und IFN γ unter Zugabe von Kortisol im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (ohne Hormon/ ohne Kortisol) unter Stimulation (LPS für IL-6, ConA für die übrigen Zytokine) im humanen Vollblutassay betrachtet. Hierbei zeigte sich weitgehend eine Hemmung der Zytokinsekretion durch Testosteron (IFN γ ohne Kortisolzusatz, IL-2 ohne Kortisol und teilweise auch IL-4 ohne Kortisol, IL-10 mit und ohne Kortisol, TNF α ohne Kortisol und IL-2 mit Kortisol). Unter Vorinkubation mit E2 (10^{-10} und 10^{-9} mol/l) kam es zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Sekretion, für die übrigen Zytokine ergab sich lediglich eine nichtsignifikante Tendenz zur gesteigerten Sekretion. Ebenso zeigten sich die Zytokinwerte unter E2 im Vergleich zu denen mit Testosteronvorinkubation erhöht (IL-6, IL-4 ohne Kortisol, teilweise bei IFN γ ohne Kortisol, IL-10 ohne Kortisol, TNF α und IL-2), wobei auch hier die Tendenz ersichtlich wird, dass die Unterschiede unter der geringsten verwendeten E2-Konzentration am stärksten ausfallen. Bei Testosteronvorinkubation war das IFN γ /IL-4-Verhältnis zugunsten des IFN γ und somit im Sinne einer Th1-Antwort verschoben (signifikant unter Kortisoleinfluss). Hinsichtlich möglicher Interaktionen in der Wirkung von Testosteron beziehungsweise E2 mit Kortisol ergaben sich in diesem Versuchsansatz keine Hinweise. Ein Einfluss durch Testosteron- beziehungsweise E2-Vorinkubation auf die Gesamtzahl des hGR konnte im Westernblot nicht nachgewiesen werden. Mögliche Interaktionen könnten jedoch auf Ebene der HPA-Achse bestehen und eine mögliche klinische Relevanz haben.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Zinkernagel R. Grundlagen der Immunologie. In: Kayser F, Bientz K, Eckert J, Zinkernagel R, editors. Medizinische Mikrobiologie. 43-136. 1997. Stuttgart, New York, Thieme.
- (2) Noble A. Molecular signals and genetic reprogramming in peripheral T-cell differentiation. *Immunology* 101, 289-299. 2000.
- (3) Sad S; Marcotte R; Mosmann T. Cytokine-induced differentiation of precursor-mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2, 271-279.
- (4) Croft M; Carter L; Swain S; Dutton R. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 180, 1715-1728. 1994.
- (5) Noble A; Macary P; Kemeny D. IFN-gamma and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8⁺ T cells into subpopulations with distinct cytokine profile. *J Immunol* 155, 2928-2937. 1995.
- (6) Fiers W; Beyaert R; Brouckaert P; Everaerd B; Haegeman G; Suffys P; Tavernier J; Vandenabeele P; Vanhaesebroeck B; Van Ostade X. Gene cloning and structure-function relationship of cytokines such as TNF and interleukins. *Immunol Lett* 16, 219-226. 1987.

- (7) Satomi N; Haranaka K; Kunii O. Research on the production site of tumor necrosis factor (TNF). *Jpn J Exp Med* 51, 317-322. 1981.
- (8) Smith K; Lachman L; Oppenheim J; Favata M. The functional relationship of the interleukins. *J Exp Med* 151, 1551-1556. 1980.
- (9) Rennick D; Berg D; Holland G. Interleukin 10: an overview. *Prog Growth Factor Res* 4, 207-227. 1992.
- (10) Spits H; de Waal Malefyt R. Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Immunol* 99, 8-15. 1992.
- (11) Löffler G; Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. 5. Auflage . 1997.
- (12) Barnes P; Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular and mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 14, 436-441. 1993.
- (13) Boumpas D; Chrousos G; Wilder R; Cupps T; Balow J. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119, 1198-1208. 1993.
- (14) Bamberger C; Schulte H; Chrousos G. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17, 245-261. 1996.

- (15) Truss M; Beato M. Steroid hormone receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14, 459-479. 1993.
- (16) Tsai M; O'Malley B. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-486. 1994.
- (17) Oakley R; Webster J; Jewell C; Sar M; Cidlowski J. Immunocytochemical analysis of the glucocorticoid receptor alpha isoform (GR α) using a GR α -specific antibody. *Steroids* 64, 742-751. 1999.
- (18) Goulding N; Guyre P. Glucocorticoids, lipocortins and the immune response. *Curr Opin Immunol* 5, 108-113. 1993.
- (19) Buttgereit F; Brink I; Thiele B; Burmester G; Hiepe F; Hall E. Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 850-853. 1995.
- (20) Barnes P; Karin M. Nuclear factor- κ B- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066-1071. 1997.
- (21) Boumpas D. A novel action of glucocorticoids- NF- κ B inhibition. *Br J Rheumatol* 35, 709-710. 1996.
- (22) Agarwal S; Marshall G Jr. Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J Interferon Cytokine Res* 18, 1059-1068. 1998.

- (23) Fessler B; Paliogianni F; Hama N; Balow J; Boumpas D. Glucocorticoids modulate CD28 mediated pathways for interleukin 2 production in human T cells: evidence for posttranscriptional regulation. *Transplantation* 62, 1113-1118. 1996.
- (24) Ristimäki A; Narko K; Hla T. Down-regulation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem J* 318, 325-331. 1996.
- (25) Buttgerit F; Wehling M; Burmester G. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions. *Arthritis Rheum* 41, 761-767. 1998.
- (26) Buttgerit F; Scheffold A. Rapid glucocorticoid effect on immune cells. *Steroids* 67, 529-534. 2002.
- (27) Bartholome B; Spies C; Gaber T; Schuchmann S; Berki T; Kunkel D; Bienert M; Radbruch A; Burmester G; Lauster R; Scheffold A; Buttgerit F. Membrane glucocorticoid receptors (mGR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB* 18, 70-80. 2004.
- (28) Vottero A; Chrousos G. Glucocorticoid receptor β : view I. *Trends Endocrinol Metab* 10, 333-338. 1999.
- (29) Oakley R; Sar M; Cidlowski J. The human glucocorticoid receptor β isoform: expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 271, 9550-9559. 1996.

- (30) Oakley R; Webster J; Sar M; Parker C; Cidlowski J. Expression and subcellular distribution of the β -isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 138, 5028-5038. 1997.
- (31) Bamberger C; Bamberger A; de Castro M; Chrousos G. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 95, 2435-2441. 1995.
- (32) Carlstedt-Duke J. Glucocorticoid receptor β : view II. *Trends Endocrinol Metab* 10, 339-342. 1999.
- (33) Rivers C; Levy A; Hancock J; Lightman S; Norman M. Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocr Metab* 84, 4283-4286. 1999.
- (34) Cidlowski J; Bellingham D; Powell-Oliver F; Lubahn D; Sar M. Novel antipeptide antibodies to the human glucocorticoid receptor: recognition of multiple receptor forms in vitro and distinct localization of cytoplasmatic and nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 4, 1427-1437. 1990.
- (35) Scheinman R; Gualberto A; Jewell C; Cidlowski J; Baldwin A. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15, 943-953. 1995.
- (36) Strickland I; Kisich K; Hauk P; Vottero A; Chrousos G; Klemm D; Leung D. High constitutive glucocorticoid receptor β in human neutrophils enables them to reduce

their spontaneous rate of cell death in response to glucocorticoids. *J Exp Med* 193, 585-593. 2001.

- (37) Webster J; Oakley R; Jewell C; Cidlowski J. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta-isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6865-6870. 2001.
- (38) Kumar R; Thompson E. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319. 1999.
- (39) Brinkmann A; Faber P; van Rooij H; Kuiper G; Ris C; Klaassen P; van der Korput J; Voorhorst M; van Laar J; Mulder E. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* 34, 307-310. 1989.
- (40) Ansar Ahmed S; Penhale W; Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol* 121, 531-551. 1985.
- (41) Grossman C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *J Steroid Biochem* 34, 241-251. 1989.
- (42) Schuurs A; Verheul H. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem* 35, 157-172. 1990.

- (43) Talal N. Sex steroid hormones and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 24, 1054-1056. 1981.
- (44) Felson D. Epidemiology of rheumatic diseases. In: McCarty D, Koopman W, editors. *Arthritis and allied conditions: A textbook of rheumatology*. Philadelphia, 1993, 17-48.
- (45) Beeson P. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med* 96, 457-462. 1994.
- (46) da Silva J. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Ann Rheum Dis* 54, 6-16. 1995.
- (47) Cutolo M; Wilder R. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic disease. *Rheum Dis Clin North Am* 26, 825-839. 2000.
- (48) Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28(5), 521-574. 2007.
- (49) Cutolo M; Balleari E; Giusti M; Intra E; Accardo S. Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34, 1-5. 1991.
- (50) Hall G; Daniels M; Huskisson E; Spector T. A randomized controlled trial of the effect of hormone replacement therapy on disease activity in postmenopausal rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 53, 112-116. 1994.

- (51) Kaufman J; Vermeulen A. Declining gonadal function in elderly men. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 11, 289-309. 1997.
- (52) Straub RH; Konecna L; Hrach S; Rothe G; Kreutz M; Schölmerich J; Falk W; Lang B. Serum Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocr Metab* 83, 2012-2017. 1998.
- (53) Straub RH; Cutolo M; Zietz B; Schölmerich J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and the nervous systems. *Mech Ageing Dev* 122, 1591-1611. 2001.
- (54) Straub RH; Paimela L; Peltomaa R; Schölmerich J; Leirisalo-Repo M. Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to IL-6 and TNF in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 654-662. 2002.
- (55) Straub RH; Schölmerich J; Zietz B. Replacement therapy with DHEA plus corticosteroids in patients with chronic inflammatory diseases - substitutes of adrenal and sex hormones. *Z Rheumatol* 59, 108-118. 2000.
- (56) Andus T; Klebl F; Rogler G; Bregenzer N; Schölmerich J; Straub RH. Patients with refractory Crohn's disease or ulcerative colitis respond to dehydroepiandrosterone: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 17(3), 409-414. 2003.

- (57) Holdstock G; Chastenay B; Krawitt G. Effect of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. *Clin Exp Immunol* 47, 449-456. 1982.
- (58) Wyle F; Kent J. Immunosuppression by sex steroid hormones. The effect upon PHA- and PPD-stimulated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 27, 407-415. 1977.
- (59) Angele M; Knoferl M; Schwacha M; Ayala A; Cioffi W; Bland K; Chaudry I. Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 277, C35-C42. 1999.
- (60) Cutolo M; Masi T. Do androgens influence the pathophysiology of rheumatoid arthritis? Facts and hypotheses. *J Rheumatol* 25, 1041-1047. 1998.
- (61) D'Agostino P; Milano S; Barbera C; Di Bella G; La Rosa M; Ferlazzo V; Faruggio R; Miceli D; Miele M; Castagnetta L; Cillari E. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 876, 426-429. 1999.
- (62) Kanda N; Tsuchida T; Tamaki K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 106, 410-415. 1996.
- (63) Olsen N; Kovacs W. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 17, 369-384. 1996.
- (64) Cohen J; Danel L; Cordier G. Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *J Immunol* 131, 2767-2771. 1983.

- (65) Kovacs W; Olsen N. Androgen receptors in human thymocytes. *J Immunol* 139, 490-493. 1987.
- (66) Paavonen T; Andersson L; Adlercreutz H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *J Exp Med* 154, 1935-1945. 1981.
- (67) Stimson W; Hunter I. An investigation into the immunosuppressive properties of estrogen. *J Endocrinol* 69, 42-43. 1976.
- (68) Hu S-K; Mitcho Y; Rath N. Effect of estradiol on interleukin-1 synthesis by macrophages. *Int J Immuno-pharmacol* 10, 247-252. 1988.
- (69) Karpuzoglu-Sahin E; Zhi-Jun Y; Lengi A; Sriranganathan N; Ansar Ahmed S. Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. *Cytokine* 14, 208-217. 2001.
- (70) Karpuzoglu-Sahin E; Hissong B; Ansar Ahmed S. Interferon-gamma levels are upregulated by 17-beta-estradiol and diethylstilbestrol. *J Reprod Immunol* 52, 113-127. 2001.
- (71) Cutolo M; Accardo S; Villaggio B. Presence of estrogen-binding sites on macrophage-like synoviocytes and CD8+, CD29+, CD45RO+ lymphocytes in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 36, 1087-1097. 1993.

- (72) Stimson W. Estrogen and human T lymphocytes: absence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset. *Scand J Immunol* 28, 345-350. 1988.
- (73) da Silva J; Peers S; Peretti M; Willoughby D. Sex steroids affect glucocorticoid response to chronic inflammation and to interleukin-1. *J Endocrinol* 136, 389-397. 1993.
- (74) Handa R; Nunley K; Lorens S; Louie J; McGivern R; Bollnow M. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol Behav* 55, 117-124. 1994.
- (75) Lee S; Rivier C. Altered ACTH and corticosterone responses to interleukin-1 beta in male rats exposed to an alcohol diet: possible role of vasopressin and testosterone. *Alcohol Clin Exp Res* 19, 200-208. 1995.
- (76) Viau V; Meaney M. The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *J Neurosci* 16, 1866-1876. 1996.
- (77) Viau V; Chu A; Soriano L; Dallman M. Independent and overlapping effects of corticosterone and testosterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and stress-induced adrenocorticotrophic hormone release. *J Neurosci* 19, 6684-6693. 1999.

- (78) Burgess L; Handa R. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 131, 1261-1269. 1992.

- (79) Carey M; Deterd C; de Koning J; Helmerhorst F; de Kloet ER. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol* 144, 311-321. 1995.

- (80) Viau V; Meaney M. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 129, 2503-2511. 1991.

- (81) Spinedi E; Suescun M; Hadid R; Daneva T; Gaillard R. Effects of gonadectomy and sex hormone therapy on the endotoxin-stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Endocrinology* 131, 2430-2436. 1992.

- (82) Xia-Zhang L; Xiao E; Ferin M. A 5-day estradiol therapy, in amounts reproducing concentrations of the early-mid follicular phase, prevents the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by interleukin-1 alpha in the ovariectomized rhesus monkey. *J Neuroendocrinol* 7, 387-392. 1995.

- (83) Pacifici R; Brown C; Puschek E; Friedrich E; Slatopolsky E; Maggio D; McCracken R; Avioli L. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5134-5138. 1991.

- (84) Kirschbaum C; Schommer N; Federenko I; Gaab J; Neumann O; Oellers M; Rohleder N; Untiedt A; Hanker J; Pirke K; Hellhammer D. Short-term estradiol treatment enhances pituitary-adrenal axis and sympathetic responses to psychosocial stress in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3639-3643. 1996.
- (85) Polderman K; Gooren L; van der Veen E. Effects of gonadal androgens and oestrogens on adrenal androgen levels. *Clin Endocrinol* 43, 415-421. 1995.
- (86) Tazuke S; Khaw K; Barrett-Connor E. Exogenous estrogen and endogenous sex hormones. *Medicine* 71, 44-51. 1992.
- (87) Zachmann M; Manella B; Eiholzer U; Bucher H; Prader A. Influence of oestrogen in high and low doses on plasma steroid concentrations in girls with tall stature and Turner syndrome. *Acta Endocrinol* 106, 368-373. 1984.
- (88) Puder J; Freda P; Goland R; Wardlaw S. Estrogen modulates the hypothalamic-pituitary-adrenal and inflammatory cytokine responses to endotoxin in women. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2403-2408. 2001.
- (89) Carlstrom K; Stege R. Adrenocortical function in prostatic cancer patients: effects of orchidektomy or different modes of estrogen treatment on basal steroid levels and on the response to exogenous adrenocorticotrophic hormone. *Urol Int* 45, 160-163. 1990.
- (90) Rohleder N; Kudielka B; Hellhammer D; Wolf J; Kirschbaum C. Age and sex steroid-related changes in glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production after psychosocial stress. *J Neuroimmunol* 126, 69-77. 2002.

- (91) de Weerd O; Gooren L. Patterns of serum cortisol levels in ovariectomized females with and without androgen administration. *Horm Metab Res* 24, 82-84. 1992.
- (92) Vamvakopoulos N; Chrousos G. Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *J Clin Invest* 92, 1896-1902. 1993.
- (93) Galien R; Garcia T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF- κ B site. *Nucleic Acids Research* 25, 2424-2429. 1997.
- (94) Sato N; Sadar M; Bruchofsky N; Saatcioglu F; Rennie P; Sato S; Lange P; Gleave M. Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein-protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line LNCaP. *J Biol Chem* 272, 17485-17494. 1997.
- (95) Konecna L; Yan M; Miller L; Schölmerich J; Falk W; Straub RH. Modulation of IL-6 production during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *Brain Behav Immun* 14, 49-61. 2000.
- (96) Born J; Lange T; Hansen K; Molle M; Fehm H. Effect of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol* 158, 4454-4464. 1997.
- (97) Petrovsky N; Harrison L. The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol* 16, 635-649. 1998.

- (98) Jung J; Ishida K; Nishihara T. Anti-estrogenic activity of fifty chemicals evaluated by in vitro assays. *Life Sci* 74, 3065-3074. 2004.
- (99) Lee M; Kim E; Kim T. Exposure to 4-tert-octylphenol, an environmentally persistent alkylphenol, enhances interleukin-4 production in T-cells via NF-AT activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 197, 19-28. 2004.
- (100) Lindgren B; Isaksson M; Stern I; Hall K. Insulin-like growth factor binding protein 1 from Hep G2 cells is potently inhibited by the truncated IGF-I analogue des-(1-3) IGF-I. *Acta Endocrinol* 128, 81-87. 1993.
- (101) Moreno-Cuevas J; Sirbasku D. Estrogen mitogenic action. III. Is phenol red a "red herring"? *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36, 447-464. 2000.
- (102) Asai K; Hiki N; Mimura Y; Ogawa T; Unou K; Kaminishi M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock* 16, 340-343. 2001.
- (103) Clerici E; Bergamasco E; Ferrario E; Villa ML. Influence of sex steroids on the antigen-specific primary antibody response in vitro. *J Clin Lab Immunol* 34, 71-78. 1991.
- (104) Kanda N; Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol* 103, 282-288. 1999.

- (105) Medina KL; Kincade PW. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5382-5386. 1994.
- (106) Hall JM; McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-5578. 1999.
- (107) Weihua Z; Saji S; Mäkinen S; Cheng G; Jensen EV; Warner M; Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5936-5941. 2000.
- (108) Rogler G; Meinel A; Lingauer A; Michl J; Zietz B; Gross V; Lang B; Andus T; Schölmerich J; Palitzsch K-D. Glucocorticoid receptors are down-regulated in inflamed colonic mucosa but not in peripheral blood mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 29, 330-336. 1999.
- (109) Kurebayashi J; Otsuki T; Moriya T; Sonoo H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 92, 1093-1101. 2001.
- (110) Stoner M; Saville B; Wormke M; Dean D; Burghardt R; Safe S. Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 16, 2231-2242. 2002.
- (111) Tamir S; Izrael S; Vaya J. The effect of oxidative stress on ERalpha and ERbeta expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81, 327-332. 2002.

- (112) Härle P; Möbius D; Carr DJ; Schölmerich J; Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 1305-1313. 2005.
- (113) Brühl H; Cihak J; Schneider MA; Plachý J; Rupp T; Wenzel I; Shakarami M; Milz S; Ellwart JW; Stangassinger M; Schlöndorff D; Mack M. Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. *J Immunol* 172, 890-898. 2004.
- (114) Yager JD; Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354, 270-282. 2006.
- (115) Dubey RK; Jackson EK. Cardiovascular protective effects of 17beta-estradiol metabolites. *J Appl Physiol* 91, 1868-1883. 2001.
- (116) Schumacher G; Neuhaus P. The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 405-410. 2001.
- (117) Josefsson E; Tarkowski A. Suppression of type II collagen-induced arthritis by the endogenous estrogen metabolite 2-methoxyestradiol. *Arthritis Rheum* 40, 154-163. 1997.
- (118) Schmidt M; Weidler C; Naumann H; Anders S; Schölmerich J; Straub RH. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--

androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5 α -reduced androgens. *Arthritis Res Ther* 7, R938-R948. 2005.

- (119) Schmidt M; Hartung R; Capellino S; Cutolo M; Pfeifer-Leeg A; Straub RH. Estrone/17 β -estradiol conversion to and TNF inhibition by estrogen metabolites in synovial cells of patients with RA and OA. submitted . 2009.
- (120) Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8, 223-246. 2009.
- (121) Romagnani S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res* 21, 152-158. 1991.
- (122) Gallo D; Battaglia A; Mantuano E; Travaglia D; De Stefano I; Buzzonetti A; Scambia G. 17 β -Estradiol and soy phytochemicals selectively induce a type 2 polarization in mesenteric lymph nodes of ovariectomized rats. *Menopause* 15, 718-725. 2008.
- (123) Uemura Y; Liu TY; Narita Y; Suzuki M; Matsushita S. 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor- α induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Hum Immunol* 69, 149-157. 2008.
- (124) Gleicher N; Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun* 28, 1-6. 2007.

- (125) Allaerts W; Salomon B; Leenen P; van Wijngaardt S; Jeucken P; Ruuls S; Klatzmann D; Drexhage H. A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells? *J Neuroimmunol* 78, 184-197. 1997.
- (126) Giometto B; Miotto D; Botteri M; Alessio L; Scanarini M; An S; Tavolato B. Folliculo-stellate cells of human pituitary adenomas; immunohistochemical study of the monocyte/macrophage phenotype expression. *Neuroendocrinology* 65, 47-52. 1997.
- (127) Renner U; Gloddek J; Pereda M; Arzt E; Stalla G. Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculo-stellate cells. *Domest Anim Endocrinol* 15, 353-362. 1998.
- (128) Vankelecom H; Carmeliet P; Van Damme J; Billiau A; Denef C. Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 49, 102-106. 1989.
- (129) Burgess L; Handa R. Hormonal regulation of androgen receptor mRNA in the brain and anterior pituitary gland of the male rat. *Brain Res Mol Brain Res* 19, 31-38. 1993.
- (130) Lethimonier C; Flouriot G; Valotaire Y; Kah O; Ducouret B. Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis. *Biol Reprod* 62, 1763-1771. 2000.

- (131) Harnish DC; Scicchitano MS; Adelman SJ; Lyttle CR; Karathanasis SK. The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor- κ B in HepG2 cells. *Endocrinology* 141, 3403-3411. 2000.
- (132) Cutolo M; Capellino S; Montagna P; Villaggio B; Sulli A; Serio B; Straub RH. New roles for estrogens in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 21, 687-690. 2003.
- (133) Weidler C; Härle P; Schedel J; Schmidt M; Schölmerich J; Straub RH. Patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus have increased renal excretion of mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. *J Rheumatol* 31, 489-494. 2004.
- (134) Jamieson P; Nyirenda M; Walker B; Chapman K; Seckl J. Interactions between oestradiol and glucocorticoid regulatory effects on liver-specific glucocorticoid-inducible genes: possible evidence for a role of hepatic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Endocrinol* 160, 103-109. 1999.
- (135) Irusen E; Matthews J; Takahashi A; Barnes P; Chung K; Adcock I. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: Role in steroid insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109, 649-657. 2002.

7. Danksagung

Für die gute Betreuung und große Geduld möchte ich mich ganz besonders bei meinem „Doktorvater“ und Mentor Rainer H. Straub bedanken.

Für Einarbeitung, Mitbetreuung und die gute Stimmung im Labor bei Angelika Gräber, Elke Lorenz, Claudia Weidler und allen anderen Mitarbeitern im Labor.

Für die Ideengebung zu meiner Arbeit und den geistigen Beistand bei Professor José António P. da Silva, Universität Coimbra, Portugal.

Meinen Freunden, die mich stets unterstützen.

Meiner Familie, insbesondere meiner Frau und meinen beiden Töchtern.

8. Lebenslauf

Name: David Bernd Janele
Geburtsdatum: 17. November 1976
Geburtsort: Regensburg
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Eltern: Monique Janele, geb. Kamper
Dr. phil. Bernd Janele

Schulbildung:

1983-1987 Besuch der Grundschule in Regensburg und Mannheim
1987-1996 Goethe-Gymnasium Regensburg, Abitur 1996, Note 1,2
Juni 1996 Zulassung und Bestehen der Prüfung für Hochbegabte, Stipendium bis
Studienende vom Freistaat Bayern
1996-1997 Wehrdienst als Sanitätssoldat in Feldkirchen

Studium:

1997-2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Praktisches
Jahr in Regensburg und Melbourne, Australien
April 2004 3. Staatsexamen, Note: sehr gut

Klinische Tätigkeit:

11/2004 bis 4/2007	Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Regensburg am Bezirksklinikum Regensburg
5/2007 bis 4/2008	Neurologisches Jahr an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg am Bezirksklinikum Regensburg und an der Fachklinik für Neurologische Rehabilitation am Bezirksklinikum Regensburg
Seit 5/2008	Fachklinik für Forensische Psychiatrie und Psychotherapie am Bezirksklinikum Regensburg

9. Publikation

Janele D, Lang T, Capellino S, Cutolo M, Da Silva JA, Straub RH. Effects of testosterone, 17beta-estradiol, and downstream estrogens on cytokine secretion from human leukocytes in the presence and absence of cortisol. *Ann N Y Acad Sci.* 1069, 168-82. 2005

Effects of Testosterone, 17 β -Estradiol, and Downstream Estrogens on Cytokine Secretion from Human Leukocytes in the Presence and Absence of Cortisol

DAVID JANELE,^a THOMAS LANG,^a SILVIA CAPELLINO,^a MAURIZIO CUTOLO,^b JOSE ANTONIO P. DA SILVA,^c AND RAINER H. STRAUB^a

^a*Laboratory of Neuroendocrinology, Department of Internal Medicine I, University Hospital, 93042 Regensburg, Germany*

^b*Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine and Medical Specialties, University of Genova, Genova, Italy*

^c*Department of Medicine III and Rheumatology, Coimbra University Hospital, Coimbra, Portugal*

ABSTRACT: Estrogens at physiological concentrations are thought to play an immune-stimulating role, whereas androgens have an anti-inflammatory impact. However, their role on cytokine secretion in the presence or absence of cortisol has not been investigated. Furthermore, the role of hydroxylated estrogens downstream of 17 β -estradiol (E2) on secretion of tumor necrosis factor (TNF) is not known. In this study on peripheral blood leukocytes of healthy male subjects, we scrutinized the influence of prior sex hormones (for 24 h) with and without later addition of cortisol (for another 24 h) on stimulated secretion of TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and interferon- γ (IFN- γ). E2 stabilized or increased immune stimuli-induced secretion of TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN γ in relation to testosterone. Testosterone, in contrast, inhibited (IL-2, IL-4, IL-10) or tended to inhibit stimulated secretion of these cytokines (TNF, IFN γ). This effect of E2 was pronounced at a concentration of 10^{-10} M (testosterone: 10^{-7} M) in the presence of cortisol. E2 (10^{-8} M, 10^{-10} M) and testosterone (10^{-7} M) did not change glucocorticoid receptor expression. The downstream estrogens 2OH-estradiol(one), 4OH-estradiol(one), and 16OH-estradiol(one) did not stimulate TNF secretion at 10^{-10} M, but even inhibited its secretion at 10^{-11} M. However, the combination of 16OH-estradiol(one) on one side and 2OH-estradiol(one) or 4OH-estradiol(one) on the other side markedly stimulated TNF secretion that was only observable in the presence of cortisol. In conclusion, at physiological concentrations, E2 and a combination of downstream estrogens

Address for correspondence: Rainer H. Straub, M.D., Laboratory of Neuroendocrinology, Department of Internal Medicine I, University Hospital, 93042 Regensburg, Germany. Voice: +49 941 944 7120; fax: +49 941 944 7121.

e-mail: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1069: 168–182 (2006). © 2006 New York Academy of Sciences.
doi: 10.1196/annals.1351.015

stabilized or increased immune stimuli-induced TNF secretion. These effects are dependent on the presence of physiological concentrations of cortisol. This study underlines the proinflammatory role of E2, which is probably dependent on conversion to a proinflammatory cocktail of downstream estrogens and the presence of cortisol.

KEYWORDS: testosterone; 17 β -estradiol; 2-hydroxyestrogens; 4-hydroxyestrogens; 16-hydroxyestrogens; cortisol; TNF; cytokines

INTRODUCTION

The pro- and anti-inflammatory effects of 17 β -estradiol (E2) and other estrogens on secretion of proinflammatory cytokines have been a matter of debate for two decades. Authors in the field of rheumatology investigated estrogens in the context of a strong proinflammatory microenvironment and came to the conclusion that estrogens most often exert a proinflammatory influence on chronic inflammatory diseases, whereas androgens are considered to be anti-inflammatory.^{1,2} The proinflammatory influence of estrogens was regarded to be a major factor for the known female-to-male preponderance in autoimmune diseases.^{1,3-5} On the other hand, researchers in the field of bone research demonstrated inhibitory effects of estrogens on cytokine secretion in a noninflamed microenvironment leading to osteoprotective effects.^{6,7} This discrepancy probably depends on very different conversion of estrogens to downstream metabolites.

A proinflammatory microenvironment leads to conversion of androgens to E2 and downstream estrogens⁸ that are further converted to 16-hydroxylated active estrogens but not to 2-hydroxylated endogenous anti-estrogens.^{9,10} In contrast, in normal macrophages, conversion of androgens to estrogens is much less pronounced and 16-hydroxylated estrogens were not detected.¹¹ Furthermore, in osteopenic postmenopausal women without inflammation, 16-hydroxylated estrone levels are much lower and correlated positively with bone mineral density, whereas levels of 2-hydroxylated anti-estrogens showed a negative correlation with bone mineral density.^{12,13} This indicates that the relation of 16-hydroxylated to 2-hydroxylated estrogens is completely different in chronic inflammatory diseases as compared to the situation in postmenopausal women with osteoporosis and without inflammation.

Breast cancer research revealed a mitogenic tumor growth-stimulating role of 16 α -hydroxylated estrogens, which indicates the potent estrogenic activity of these hormones.¹⁴ *In vivo* animal studies demonstrated a strong TNF-increasing role of 16-hydroxyestradiol (estriol).^{15,16} Other conversion products of estrone and 17 β -estradiol are the 2-hydroxylated estrogens, such as 2-hydroxyestrone and 2-hydroxyestradiol. In contrast to 16 α -hydroxylated estrogens, the 2-hydroxylated forms inhibit growth-promoting effects of 17 β -estradiol.¹⁷ Furthermore, the estrogen metabolism pathway favoring

2-hydroxylation over 16 α -hydroxylation is associated with a reduced risk of invasive breast cancer in premenopausal women.¹⁸ We can summarize that 16 α -hydroxylated estrogens are biologically active, proinflammatory, and proliferative, whereas the 2-hydroxylated metabolites act as naturally occurring estrogen antagonists.

Apart from the very different metabolism of E2 to downstream estrogens under inflamed and noninflamed conditions, the presence of glucocorticoids may play an additional role for effects of sex hormones on proinflammatory cytokine secretion from peripheral blood leukocytes and local macrophages. At least on the level of the hypothalamus and pituitary gland, it has been demonstrated that females mount a stronger hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis response, and gonadectomy diminishes or abrogates this effect.^{2,19} It was discussed that feedback inhibition by cortisol of the hypothalamus or the pituitary gland may be modulated by sex hormones.^{2,19} The possibility that similar interactions between sex hormones and cortisol occur in peripheral leukocytes would have implications in understanding the known gender dimorphism of the immune and neuroendocrine system.

In this study, we focussed on the role of testosterone and E2 on cytokine secretion from human peripheral blood leukocytes in the presence and absence of cortisol. For this pilot study, we used blood leukocytes because of their availability in healthy subjects. Furthermore, we studied effects on cytokine secretion caused by downstream E2 metabolites: 16-hydroxylated estrogens, 2-hydroxylated estrogens, and 4-hydroxylated estrogens. In addition, we investigated whether or not E2 and testosterone modulate glucocorticoid receptor expression.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Blood Samples

For cytokine secretion studies, 9 (age 24–40 years) and, for analysis of glucocorticoid receptor expression, 15 (24–40 aged) healthy male subjects were recruited. All subjects were informed about the purpose of the experiments and gave informed consent for further use of blood samples. Blood was drawn in heparinized tubes between 9:00 and 10:00 AM and immediately processed.

Culture Conditions and Application of Sex Hormones and Cortisol

For cytokine secretion studies, a defined volume of whole blood was cultured in 48-well plates together with serum-free medium (whole blood assay in RPMI 1640 without phenol red, 0.57 mM ascorbic acid, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). Preliminary assays demonstrated optimal cytokine secretion when using 100 μ L of whole blood (for IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ , and

TNF) and 25 μL of whole blood (for IL-6) in an end volume of 1,250 μL (TABLE 1). During the first 24 h, cells were incubated with vehicle, testosterone (10^{-7} and 10^{-8} mol/L, Sigma Aldrich), E2 (10^{-8} and 10^{-10} mol/L, Sigma Aldrich), 2-hydroxyestradiol (10^{-10} and 10^{-11} mol/L, Steraloids, Newport, Rhode Island, USA), 2-hydroxyestrone (10^{-10} and 10^{-11} mol/L, Steraloids), 4-hydroxyestradiol (10^{-10} and 10^{-11} mol/L, Steraloids), 4-hydroxyestrone (10^{-10} and 10^{-11} mol/L, Steraloids), 16-hydroxyestradiol (10^{-10} and 10^{-11} mol/L, Steraloids), and 16-hydroxyestrone (10^{-10} and 10^{-11} mol/L, Steraloids). After 24 h, the culture medium was removed and substituted with new medium without sex hormones, carrying lipopolysaccharide (LPS for IL-6 stimulation, 0.5 ng/mL, Sigma Aldrich) or concanavalin A (100 $\mu\text{g/mL}$, for stimulation of other cytokines, Sigma Aldrich), two strong immune stimuli, with or without cortisol (hydrocortisone, 10^{-6} mol/L, Pharmacia Upjohn, Karlsruhe, Germany). We used cortisol at 10^{-6} mol/L because in preceding whole blood assays with naturally available binding proteins this concentration yielded half-maximum inhibition of TNF secretion (without cortisol: 109.1 ± 9.7 pg TNF/mL [100%] vs. with cortisol: 79.4 ± 5.1 pg TNF/mL [73%]). These first assays also demonstrated that the observed decrease of about 27% reflects the half-maximum effect of cortisol. After 12 and 24 h, supernatants were taken and stored at -30°C . TABLE 1 summarizes applied conditions.

For analysis of the influence of sex hormones on glucocorticoid receptor expression, 30 mL of heparinized whole blood were cultured in 25 cm^2 culture flasks (70 mL) for 24 h with vehicle, testosterone (10^{-7} mol/L), or 17β -estradiol (10^{-8} and 10^{-10} mol/L, Sigma Aldrich). In these experiments, no cortisol was added. After 24 h, cultured cells were re-suspended, centrifuged, treated twice with distilled water to remove erythrocytes, and washed twice in phosphate-buffered saline (Sigma Aldrich). Then, leukocytes were lysed for 30 min in lysis buffer containing PMSF, SDS, NP-40, sodium deoxycholate, and a mixture of protein inhibitors ("complete" from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After centrifuging, supernatants were stored at -30°C . Protein concentrations were measured using the BCA assay (reagents from Sigma Aldrich).

TABLE 1. Mode of stimulation, use of whole blood, and observation time for different cytokines

Cytokine	Volume of WB [μL]	Stimulation	Observation Time [h]
IL-2	100	ConA 100 $\mu\text{g/mL}$	24
IL-4	100	ConA 100 $\mu\text{g/mL}$	24
IL-6	25	LPS 0.5 ng/mL	12
IL-10	100	ConA 100 $\mu\text{g/mL}$	12
IFN γ	100	ConA 100 $\mu\text{g/mL}$	24
TNF α	100	ConA 100 $\mu\text{g/mL}$	12

Cytokine Determination in Supernatants

The cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , and TNF were measured by immunometric enzyme immunoassays making use of antibody pairs (OptEIATM, BD Pharmingen, San Diego, CA). In our hands, intra- and inter-assay coefficients of variation were below 10%. The detection limit was approximately 4–20 pg/mL depending on the cytokine tested.

Western Blotting

Gels (Novex 8% Tris-Glycine, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) were loaded with 25 μ g of protein and, after electrophoretic processing, transferred to nitro-cellulose. Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 2.5% of human serum protein and 2.5% of bovine serum albumin (Biomol, Hamburg, Germany). Blots were then incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies against the human glucocorticoid receptor (1:500 in 5% nonfat dry milk in TBS, Affinity Bioreagents, Golden, Colorado, USA). Subsequently, membranes were washed in TBS and incubated with secondary antibodies (1:1000 in TBS, horseradish peroxidase-conjugated, Affinity Bioreagents). After another washing step, blots were developed using chemiluminescent reagents (ECL+, Amersham Biosciences, Amersham, UK) and then subjected to autoradiography. The films (Hyperfilm, Amersham, UK) were scanned and analyzed using a densitometric method (Molecular Dynamics, Amersham, UK).

Statistical Analysis and Data Presentation

Data are given as the mean \pm SEM. Medians were compared by Mann-Whitney test (SPSS/PC for Windows 11.0, SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Influence of Testosterone and E2 on Cytokine Secretion in the Presence and Absence of Cortisol

In order to test the influence of testosterone and E2 on cytokine secretion, we used physiological concentrations of these hormones in a relatively natural microenvironment (whole blood). In the presence of cortisol, E2, in relation to testosterone, at concentrations of 10^{-8} and 10^{-10} mol/L stabilized secretion of TNF, IL-2, IFN γ , and IL-10 (FIGS. 1A, 1C, 1D, and 2B). For IL-6 and IL-4, only E2 at 10^{-10} mol/L exerts similar effects (FIGS. 1B and 2A). E2 at 10^{-10}

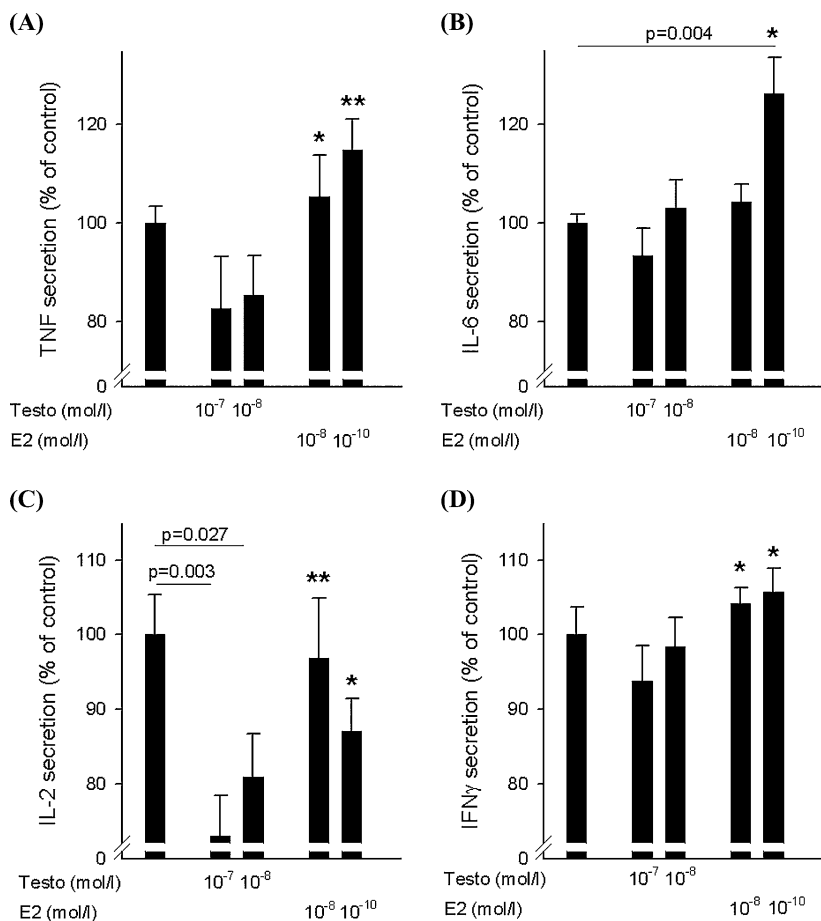


FIGURE 1. Modulation of cytokine secretion by 17 β -estradiol (E2) and testosterone in the presence of cortisol. Whole blood of five healthy male subjects was incubated in triplicate with vehicle, testosterone, and E2 for 24 h at indicated concentrations. After 24 h, medium was replaced and cells were stimulated with 0.5 ng/mL LPS (IL-6) or 100 μ g/mL concanavalin A (TNF, IL-2, IFN γ) for further 12 h (IL-6, TNF) or 24 h (IL-2, IFN γ) in the presence of 10⁻⁶ mol/L cortisol. Supernatants were removed and cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Means \pm SEM are shown for TNF (A: control = 79.4 \pm 5.1 pg/mL), IL-6 (B: control = 857 \pm 137 pg/mL), IL-2 (C: control = 289 \pm 27 pg/mL), and IFN γ (D: control = 521 \pm 49 pg/mL). * P < 0.05, ** P < 0.01 versus the respective concentration of testosterone.

mol/L stimulated IL-6 secretion in relation to vehicle (FIG. 1B). With respect to other cytokines, E2 had no stimulating activity in relation to vehicle (FIGS. 1 and 2). In the absence of 10⁻⁶ mol/L cortisol, we observed very similar effects for IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10 (data not shown).

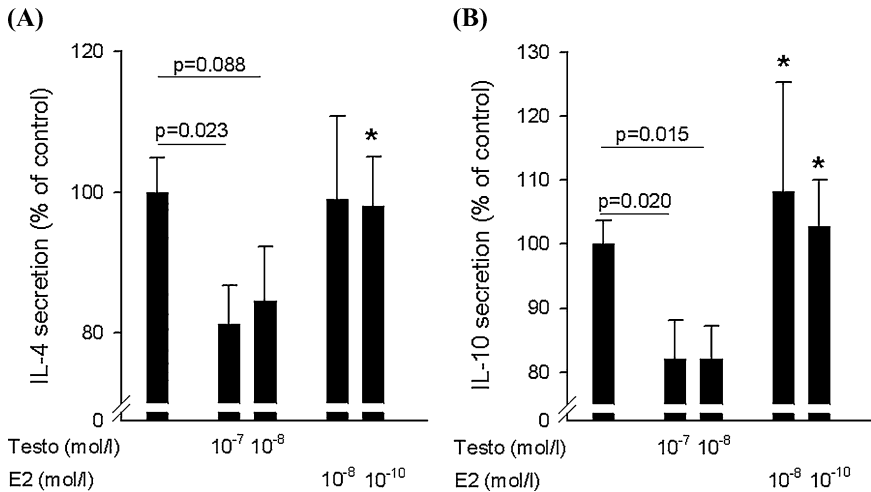


FIGURE 2. Modulation of cytokine secretion by 17 β -estradiol (E2) and testosterone in the presence of cortisol. Means \pm SEM are shown for IL-4 (A: control = 94.5 \pm 13.5 pg/mL) and IL-10 (B: control = 127.1 \pm 8.4 pg/mL). Whole blood of five healthy male subjects was incubated in triplicate with vehicle, testosterone, and E2 for 24 h at indicated concentrations. After 24 h, medium was replaced and cells were stimulated with 100 μ g/mL concanavalin A for further 24 h in the presence of 10⁻⁶ mol/L cortisol. * P < 0.05 versus respective concentration of testosterone.

With respect to testosterone, in the presence of cortisol, this hormone at 10⁻⁷ and 10⁻⁸ mol/L inhibited secretion of IL-2, IL-4, and IL-10 (Figs. 1C, 2A, and 2B), and it tended to inhibit TNF and IFN γ (Figs. 1A and 1D) but not IL-6 (FIG. 1B). Similar effects on IL-2, IL-4, and IL-10 were seen in the absence of cortisol (data not shown).

Influence of Testosterone and E2 on Glucocorticoid Receptor Expression

Neither testosterone at 10⁻⁷ mol/L nor E2 at 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ mol/L changed glucocorticoid receptor expression (FIG. 3).

Effects of Downstream Metabolites of E2 on TNF Secretion

Since metabolites of estrogens may modulate cytokine secretion, we investigated effects of various metabolites of E2 and their combinations on TNF secretion in the presence of cortisol. Metabolites were used in concentrations similar to those E2 (or lower) because their maximum concentration is expected to be equal to or lower than the concentration of the precursor E2. In the presence of

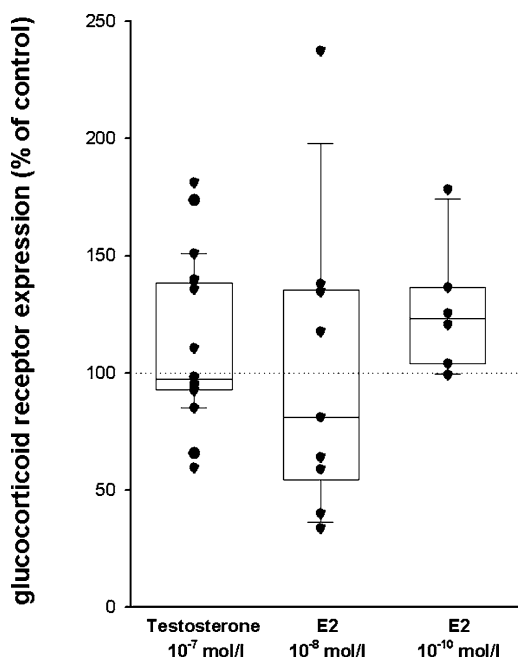


FIGURE 3. Influence of testosterone and 17β -estradiol (E2) on glucocorticoid receptor expression in peripheral blood leukocytes. The values are given in percent densitometric control, which is indicated by *dotted horizontal line*. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, a line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. *Black symbols* give the individual values of participating subjects (for T at 10^{-7} M = 9, for E2 at 10^{-8} M = 9, and for E2 at 10^{-10} M = 6).

cortisol, all investigated metabolites at 10^{-10} mol/L did not change TNF secretion (FIG. 4A). Thus, these effects were similar as compared to E2 (compare FIG. 1A). Interestingly, sole application of 2-hydroxyestradiol, 2-hydroxyestrone, 4-hydroxyestrone, or 16-hydroxyestradiol at 10^{-11} mol/L inhibited secretion of TNF (FIG. 4A). Similarly, sole application of 4-hydroxyestradiol or 16-hydroxyestrone tended to inhibit TNF secretion (FIG. 4A).

One molecule of E2 may be converted to different downstream metabolites. In order to further delineate effects of combinations of estrogens downstream of E2, 16-hydroxyestradiol and 16-hydroxyestrone at 10^{-10} mol/L were combined with the other metabolites. It is obvious that combinations of 16-hydroxyestradiol (16OHE2) at 10^{-10} mol/L and 2- and 4-hydroxylated estrogens at 10^{-11} mol/L markedly increased TNF secretion (FIG. 4B). Thus, a preponderance of 16-hydroxyestradiol over 2-/4-hydroxylated estrogens using a ratio of 10:1 increased TNF secretion. A similar increase was observed for the combination of 16-hydroxyestrone (16OHE1) and 4-hydroxylated

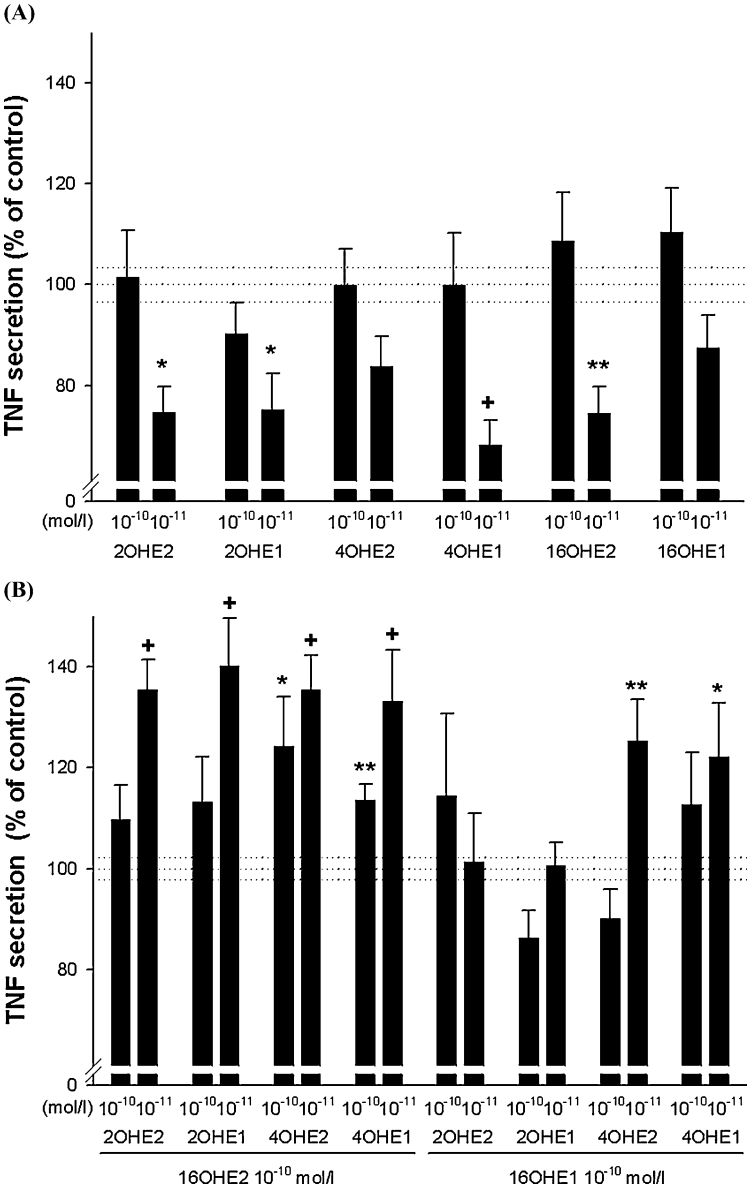


FIGURE 4. Influence of downstream metabolites of 17 β -estradiol (E2) on secretion of TNF. **(A)** Influence of individual metabolites on TNF secretion. Control TNF was 54.1 ± 5.2 pg/mL. **(B)** Influence of combinations of metabolites on TNF secretion. Control TNF was 21.8 ± 2.1 pg/mL. For both panels: Data are given as means \pm SEM in percent of control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, + $P < 0.001$ versus control. Abbreviations: 2OHE2, 2-hydroxyestradiol; 2OHE1, 2-hydroxyestrone; 4OHE2, 4-hydroxyestradiol; 4OHE1, 4-hydroxyestrone; 16OHE2, 16-hydroxyestradiol; 16OHE1 (= estriol), 16-hydroxyestrone.

TABLE 2. Effect of the combination of 16-hydroxylated estrogens and 2-/4-hydroxylated estrogens on secretion of TNF in the absence of cortisol.

16-Hydroxylated Estrogen	2-/4-Hydroxylated Estrogen	TNF Secretion (% of Control)
—	—	Control: 100 ± 4.2
16OH-estradiol 10^{-10} mol/L	2OH-estradiol 10^{-11} mol/L	91.4 ± 10.9
	2OH-estrone 10^{-11} mol/L	77.7 ± 10.1
	4OH-estradiol 10^{-11} mol/L	100.8 ± 7.6
	4OH-estrone 10^{-11} mol/L	123.2 ± 16.5
16OH-estrone 10^{-10} mol/L	2OH-estradiol 10^{-11} mol/L	$66.8 \pm 5.7^*$
	2OH-estrone 10^{-11} mol/L	$54.5 \pm 6.8^{**}$
	4OH-estradiol 10^{-11} mol/L	104.1 ± 5.2
	4OH-estrone 10^{-11} mol/L	119.5 ± 24.7

Data are given as means \pm SEM.

Control TNF = 55.0 ± 4.5 pg/mL. $^*P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$ for the comparison versus control.

metabolites but not for 2-hydroxylated estrogens (FIG. 4B). Such a stimulatory effect of combinations of downstream metabolites was not observed in the absence of cortisol (TABLE 2). In contrast, in the absence of cortisol, the combination of 16-hydroxyestrone and 2-hydroxylated estrogens even inhibited TNF secretion (TABLE 2).

DISCUSSION

This study showed dichotomous effects of sex hormones: E2 and metabolites stabilized or increased cytokine secretion whereas testosterone inhibited this secretion. This dual role of estrogens and testosterone on cytokine secretion has been described in the literature and it was thought that this phenomenon could explain the well-known female-to-male preponderance in acquiring autoimmune diseases, particularly when TNF and IFN γ play a dominant disease-perpetuating role.^{1,3-5} However, two aspects have not been studied so far.

First, the additional role of cortisol for sex hormone modulation of cytokines from peripheral blood leukocytes has been unclear. This can be important because these mechanisms may explain interactions of hormones on the level not only of the pituitary gland, but also in peripheral inflammation. We demonstrated that a stimulus of the HPA axis (injection of IL-1 β , ether anesthesia, or granulomatous disease) led to stronger corticosterone responses in female than in male mice,¹⁹ which corroborated a similar study in humans.²⁰ Evidence from the literature strongly supports the concept that estrogens enhance and androgens diminish the glucocorticoid response to a variety of inflammatory and noninflammatory stimuli. Although the mechanisms for these interactions are not fully elucidated, there is strong evidence that sex steroids affect the expression of glucocorticoid receptors in the central nervous system and

modulate the negative feedback exerted by cortisol at the hypothalamus.^{2,19} These observations led us to hypothesize that cortisol interacts with testosterone or estradiol on the cellular level, which can be studied in humans using peripheral blood leukocytes. This study demonstrates that E2 (in relation to testosterone) stimulated production of TNF, IL-6, IL-2, IFN γ , IL-4, and IL-10 caused by the proinflammatory influence of applied immune stimuli (LPS and Con A). The question arises as to how these findings may be linked to the estrogenic support of the HPA axis response.

It has been demonstrated that the pituitary folliculo-stellate cell is a macrophage type of cell located in the pituitary gland.^{21,22} This type of cell, similar to peripheral blood monocytes/macrophages, can be stimulated by immune stimuli in order to produce proinflammatory cytokines locally.^{23,24} Locally produced cytokines can act as secretagogues for ACTH and other pituitary hormones.²⁴ In this respect, the folliculo-stellate cell may be an important local linking element between immune stimuli and hormone production.²⁴ In this present study, we have shown that E2 stabilized (in relation to testosterone) or increased cytokine secretion induced by stimulatory agents in peripheral blood cells. A similar effect upon the folliculo-stellate cell might explain the facilitating effects of E2 on pituitary hormone secretion and the inhibitory effect of testosterone via an increase or decrease of locally produced cytokines, respectively.

The second open question that was addressed in this study is the role of downstream metabolites of E2 on stimulated TNF secretion. Our results demonstrate that the ratio of 16-hydroxylated estrogens in relation to 2-/4-hydroxylated estrogens is important for TNF secretion. We were able to describe that a ratio of 10:1 of 16-hydroxyestradiol in relation to 2-/4-hydroxylated estrogens markedly stimulated TNF secretion in the presence of cortisol. This effect was not observed in the absence of cortisol. Furthermore, in the absence of cortisol, the combination of 16-hydroxyestrone and 2-hydroxylated estrogens even strongly inhibited TNF secretion. These results delineate the importance of downstream estrogens in respective concentrations. Again, this may play a role not only on the pituitary level, but also in the peripheral immune response. As pointed out in the introduction to this article, in persons with chronic inflammatory diseases, we observe a large shift toward 16-hydroxylated estrogens in comparison to that measure in postmenopausal osteopenic women.^{9,10,12,13} Authors in the field of rheumatology trust that estrogens exert proinflammatory effects in most rheumatic diseases, whereas authors in bone research believe that estrogens prevent osteoporosis through inhibition of cytokine secretion. We suggest the following model to find an answer for this obvious discrepancy (FIG. 5):

In the noninflammatory situation, an osteopenia-inducing milieu (FIG. 5, left panel) is characterized by increased levels of 2-hydroxylated estrogens and low levels of 16-hydroxylated estrogens.^{12,13} This balance would diminish the basal secretion of TNF, IL-1, and IL-6 and, therefore, avoid bone loss

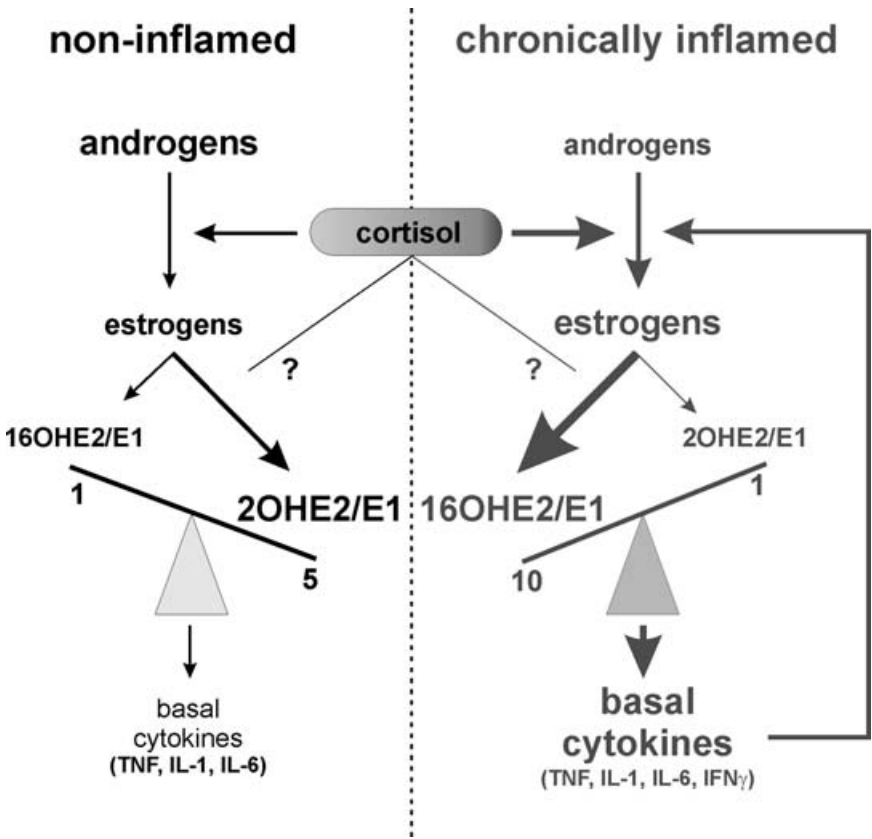


FIGURE 5. Model of the estrogen influence on secretion of proinflammatory cytokines in a noninflamed and chronically inflamed microenvironment. For abbreviation of estrogens see legend to FIGURE 4. *Left panel:* In the noninflamed situation, an osteopenia-inducing milieu is characterized by increased levels of 2OHE1/E2 and low levels of 16OHE1/E2. In this situation, basal secretion of TNF, IL-1, and IL-6 is osteoclastogenic. However, TNF, IL-1 and IL-6 are markedly lower than in chronically inflamed tissue. In such a situation, administration of therapeutic estrogens probably increases the 2OHE1/E2 because this particular pathway is switched on. This would be a negative signal for the osteoclastogenic TNF secretion. *Right panel:* In contrast, during chronic inflammation in the situation of rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis, the balance is switched to 16OHE1/E2. Under these conditions, one can assume that therapeutic administration of estrogens would enhance 16OHE1/E2 over 2OHE1/E2, which would support secretion of proinflammatory cytokines. Cortisol itself is a stimulator of aromatase, and somewhat elevated cortisol concentrations in the tissue, although inadequately low in relation to inflammation, would promote estrogen-induced secretion of proinflammatory TNF. Thus, under inflamed conditions estrogens appear as proinflammatory agents whereas under noninflamed conditions estrogens appear as anti-inflammatory.

(for review see Ref. 6). In chronic inflammation (FIG. 5, right panel), administration of therapeutic estrogens probably increases the 16-hydroxylated estrogens because this particular pathway is switched on. During estrogen therapy of postmenopausal women without inflammation, the 2-hydroxylated estrogens would appear in higher concentrations compared to 16-hydroxylated estrogens, which would be a negative signal for the osteoclastogenic TNF secretion (FIG. 5, left panel). In contrast, during chronic inflammation in the situation of rheumatic diseases, such as rheumatoid arthritis, the balance is switched to estrogens and particularly to 16-hydroxylated estrogens (FIG. 5, right panel). As shown in this study, a preponderance of 16-hydroxyestradiol versus 2-/4-hydroxylated estrogens in the presence of cortisol markedly increased TNF secretion. In this situation, one can assume that therapeutic administration of estrogens would enhance 16-hydroxylated estrogens over 2-/4-hydroxylated estrogens, which would support secretion of proinflammatory cytokines (FIG. 5, right panel). Cortisol itself promotes the conversion of androgens to estrogens.²⁵ Therefore, somewhat elevated cortisol concentrations in the tissue²⁶ would result in higher estrogen levels and, indirectly, increased secretion of proinflammatory TNF. Thus, under inflammatory conditions estrogens appear as proinflammatory agents.

In conclusion, this study on peripheral blood leukocytes demonstrated that E2 stabilized or increased and testosterone inhibited immune stimuli-induced secretion of proinflammatory cytokines, such as TNF and IFN γ . Furthermore, combined application of 16-hydroxylated estrogens and 2-/4-hydroxylated estrogens in a ratio of 10:1 increased TNF secretion only in the presence of cortisol. The findings of this study shed new light on the gender dimorphism of the neuroendocrine and immune systems. Furthermore, it demonstrated that distinct cocktails of downstream E2 metabolites may induce pro- or anti-inflammatory responses in blood leukocytes. Further studies in folliculostellate cells and synovial cells of patients with rheumatoid arthritis are needed in order to further elucidate the importance of these findings on the local level.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Str 511/10 – 1).

REFERENCES

1. CUTOLO, M. & R. WILDER. 2000. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **26**: 825–839.
2. DA SILVA, J.A. 1995. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Ann. Rheum. Dis.* **54**: 6–16.

3. TALAL, N. 1981. Sex steroid hormones and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **24**: 1054–1056.
4. KANDA, N. *et al.* 1999. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **42**: 328–337.
5. STRAUB, R.H. & M. CUTOLO. 2001. Involvement of the hypothalamic–pituitary–adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum.* **44**: 493–507.
6. MANOLAGAS, S.C. & R.L. JILKA. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **332**: 305–311.
7. PACIFICI, R. 1996. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **11**: 1043–1051.
8. CASTAGNETTA, L.A. *et al.* 2003. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **30**: 2597–2605.
9. LAHITA, R.G. *et al.* 1979. Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **22**: 1195–1198.
10. WEIDLER, C. *et al.* 2004. Patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus have increased renal excretion of mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. *J. Rheumatol.* **31**: 489–494.
11. SCHMIDT, M. *et al.* 2000. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J. Endocrinol.* **164**: 161–169.
12. LIM, S.K. 1997. Altered hydroxylation of estrogen in patients with postmenopausal osteopenia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**: 1001–1006.
13. LEELAWATTANA, R. *et al.* 2000. The oxidative metabolism of estradiol conditions postmenopausal bone density and bone loss. *J. Bone Miner. Res.* **15**: 2513–2520.
14. SCHNEIDER, J. *et al.* 1984. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 4840–4845.
15. ZUCKERMAN, S.H. *et al.* 1996. Estradiol: a potent regulator of TNF and IL-6 expression in a murine model of endotoxemia. *Inflammation* **20**: 581–597.
16. IKEJIMA, K. *et al.* 1998. Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am. J. Physiol.* **274**: G669–G676.
17. VANDEWALLE, B. & J. LEFEBVRE. 1989. Opposite effects of estrogen and catecholesteron on hormone-sensitive breast cancer cell growth and differentiation. *Mol. Cell Endocrinol.* **61**: 239–246.
18. MUTI, P. *et al.* 2000. Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16 α -hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women. *Epidemiology* **11**: 635–640.
19. DA SILVA, J.A. *et al.* 1993. Sex steroids affect glucocorticoid response to chronic inflammation and to interleukin-1. *J. Endocrinol.* **136**: 389–397.
20. KIRSCHBAUM, C. *et al.* 1996. Short-term estradiol treatment enhances pituitary–adrenal axis and sympathetic responses to psychosocial stress in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 3639–3643.
21. ALLAERTS, W. *et al.* 1997. A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculostellate cells? *J. Neuroimmunol.* **78**: 184–197.
22. GIOMETTO, B. *et al.* 1997. Folliculostellate cells of human pituitary adenomas: immunohistochemical study of the monocyte/macrophage phenotype expression. *Neuroendocrinology* **65**: 47–52.

23. VANKELECOM, H. *et al.* 1989. Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology*. **49**: 102–106.
24. RENNER, U. *et al.* 1998. Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* **15**: 353–362.
25. SVENSTRUP, B. *et al.* 1990. Comparison of the effect of cortisol on aromatase activity and androgen metabolism in two human fibroblast cell lines derived from the same individual. *J. Steroid Biochem.* **35**: 679–687.
26. STRAUB, R.H. *et al.* 2002. Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to IL-6 and TNF in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**: 654–662.